

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Drepanocitose

**Etiologia, Fisiopatologia, Diagnóstico e Abordagens
Terapêuticas**

Adriano Fernando Tam de Jesus

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2017

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Drepanocitose
Etiologia, Fisiopatologia, Diagnóstico e Abordagens
Terapêuticas

Adriano Fernando Tam de Jesus

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientador: Doutora Isabel Bettencourt Moreira da Silva,
Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade
de Lisboa**

2017

Resumo

A drepanocitose é uma das hemoglobinopatias monogénicas mais comuns e severa no planeta, podendo colocar em risco a vida dos doentes. A presente monografia versa sobre a etiologia, fisiopatologia, diagnóstico e abordagens terapêuticas da drepanocitose, de modo a perceber a situação atual em Portugal, especialmente na área pediátrica.

A drepanocitose é caracterizada pela presença de hemoglobina S, resultante duma mutação do segundo nucleótido do sexto codão do gene *HBB*, conduzindo à substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina na 6ª posição da cadeia de globina β .

A polimerização da hemoglobina S, que conduz ao aumento da rigidez das hemácias e à vaso-oclusão, é o cerne da fisiopatologia desta doença, estando associada a muitas complicações agudas e crónicas que requerem intervenção médica imediata.

Os dados epidemiológicos sobre esta hemoglobinopatia em Portugal estão desatualizados e não foi publicado nenhum estudo novo, dificultando a eficiência das medidas de intervenção estabelecidas pela normativa 08/DSMIA de 07/09/2004. Tendo em conta estas limitações e para resolvê-las, os peritos de Programa Nacional de Diagnóstico Precoce planeiam iniciar um estudo piloto de rastreio neonatal de hemoglobinopatias dentro dos próximos três anos.

A terapêutica clínica é essencialmente preventiva, estando recomendado o uso de hidroxiureia e de transfusão de sangue crónica, que, todavia, são subutilizadas. Apesar de ser segura a administração de hidroxiureia a partir de nove meses de idade, não existem ainda estudos de longo prazo que assegurem a inexistência de efeitos antineoplásicos indesejáveis.

A única terapêutica curativa disponível continua a ser o transplante de células hematopoiéticas. Todavia, esta abordagem tem uma fonte de dadores imunocompatíveis muito restrita e o recetor acarreta um risco de infertilidade. Assim, a terapia genética é uma nova área para a descoberta de uma cura universalmente aplicável.

Palavras-chave: drepanocitose; pediatria; Portugal; epidemiologia; hidroxiureia; transfusão de sangue; novos fármacos; transplantação; terapia genética; nucleases programáveis

Abstract

A Sickle cell disease (SCD) is one of the most common and severe monogenic hemoglobinopathies in the world, putting the patient's live at risk. The present monograph deals with the etiology, pathophysiology, diagnosis and therapeutic approaches to sickle cell disease, in order to understand the current situation in Portugal, especially in the pediatric area.

SCD is characterized by the presence of hemoglobin S, that results from a mutation in the second nucleotide of the sixth codon of HBB gene, leading to substitution of amino acid glutamic acid to valine in the sixth position of β globin.

Polymerization of hemoglobin S, which leads to the rigidity of the erythrocytes and vaso-occlusion, is at the heart of the pathophysiology of SCD, being associated with many acute and chronic complications that requires immediate medical intervention.

The epidemiologic data about SCD in Portugal are outdated and no new study was published, making the intervention measures established by the 08/DMIA regulation of 07/09/2004 difficult. Given these limitations and to address them, the Programa Nacional de Diagnóstico Precoce experts plans to initiate a pilot study of neonatal screening for hemoglobinopathies within the next three years.

The management is essentially preventive, recommending the use of hydroxyurea and chronic blood transfusion, however are underused. The administration of hydroxyurea Is considered safe in infants nine months or older, but it doesn't have long-term studies to ensure that there are no undesirable antineoplastic effects.

The only cure available remains the hematopoietic cell transplantation. However, this approach has a very restricted source of immunocompatible donors and the recipient carries a risk of infertility. Thus, gene therapy is a new area for the discovery of a universally applicable cure.

Keywords: sickle cell disease; pediatrics; Portugal; epidemiology; hydroxyurea; blood transfusion; new drugs; transplantation; gene therapy; programmable nucleases

Agradecimentos

Primeiro que tudo, gostaria de agradecer a Doutora Isabel Bettencourt Moreira da Silva, pela oportunidade de realizar esta monografia e de ser a minha orientadora ao longo destes longos seis meses. Um grande obrigado à doutora pela sua orientação, disponibilidade, incentivo e acima de tudo paciência na concretização desta monografia.

Agradeço a todos os meus amigos que me deram apoio (direct ou indirectamente), nomeadamente, Catarina Barreiro, Catarina Silva (e Duarte), Inês Vaz, João Fernandes, Jorge Pereira, Manuel Cabrita, Melissa Carvalho, Sara Polainas (e Tomás) e Sophie Rey.

Agradeço também a todas as equipas da farmácia de Santa Maria e da Farmácia Azevedo e Filhos pela ajuda e ensinamentos.

E finalmente, muito obrigado à minha família pelo amor e companheirismo, por me aturarem nestes árduos seis meses.

Abreviaturas, acrónimos e siglas

5-LO – 5-lipoxigenase

ADN – ácido desoxirribonucleico

ADNg – ADN genómico

AF – anemia falciforme

AG – adição génica

AVC – acidente vascular cerebral

CEH – células estaminais hematopoiéticas

CEPI – células estaminais pluripotentes induzidas

CEs – células endoteliais

CRISPR – *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

CRISPR/Cas9 – *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein 9*

CSSCD – *Cooperative Study of Sickle Cell Disease*

CU – cordão umbilical

CVO – crise vaso-oclusiva

CVOs – crises vaso-oclusivas

CysLT – cisteínil-leucotrienos

DECH – doença do enxerto contra hospedeiro

DECHa – DECH aguda

DECHc – DECH crónica

DGPI – diagnóstico genético pré-implantação

DPN – diagnóstico pré-natal

DR – drepanocitose

DSBs – *DNA double strand breaks*

EC – ensaios clínicos

EMA – *European Medicines Agency*

EPAR – *European Public Assessment Reports*

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

FIE – focagem isoeletrica

gRNA – *Guide RNA*

GT – *gene targeting*

HAs – *homology arms*

Hb – hemoglobina

HbF – hemoglobina fetal

HLA – Antígenos Leucocitários Humanos

HP – hipertensão pulmonar

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

HU – hidroxureia

IL – interleucina

IL-13 – interleucina-13

iNKT – células T *Natural Killer* invariantes

IV – intravenosa

IVIg – imunoglobulina γ intravenosa

LTE4 – leucotrieno E4

MSD – *matched sibling donor*

MSH – *Multi-Center Study of Hydroxiurea*

PAM – *protospacer adjacent motif*

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase

PMN – células polimorfonucleares

PNDP – Programa Nacional de Diagnóstico Precoce

RA2A – recetores de adenosina A2A

RH – recombinação homóloga

RPN – rastreio pré-natal

RVD – *repeats variable diresidue*

SF – sobrecarga de ferro

STA – síndrome torácica aguda

TALENs – *transcription activator-like effector nucleases*

TALs – *transcription activator-like effector*

TCEH – transplantação de células estaminais hematopoiéticas

TDS – transfusão de sangue

TG – terapia genética

TPP – transfusão permuta parcial

TS – transfusão simples

TSG – taxa de sobrevivência global

TSLD – taxa de sobrevivência livre de doença

ZFN – *zinc finger nuclease*

ZFNs – *zinc finger nucleases*

Índice:

1	Introdução	13
2	Objetivos	14
3	Materiais e Métodos.....	15
4	Resultados e Discussão	16
4.1	Hemoglobina e Hemoglobinopatias	16
4.1.1	Estrutura da hemoglobina	16
4.1.2	Biossíntese da globina do tipo beta ao longo da ontogenia	16
4.1.3	Genótipos e Fenótipos.....	17
4.2	Epidemiologia	18
4.3	Drepanocitose.....	20
4.3.1	Etiologia.....	20
4.3.2	Fisiopatologia.....	21
4.3.3	Manifestações Clínicas	22
4.3.3.1	Agudas	23
4.3.3.2	Crônicas	25
4.3.4	Diagnóstico e Rastreio	27
4.3.5	Abordagens Terapêuticas e suas complicações	30
4.3.5.1	Hidroxiureia.....	30
4.3.5.2	Transfusão de sangue.....	32
4.3.5.3	Agentes quelantes	33
4.3.5.4	Profilaxia antibiótica e imunização	35
4.3.5.5	Terapêutica da dor	35
4.3.5.6	L-glutamina	35
4.3.5.7	Terapêutica curativa	35
4.3.5.8	Novas terapêuticas em estudo.....	37

5	Conclusões e perspectivas futuras	50
	Referências Bibliográficas	51

Índice de Figuras:

Figura 1 – Organização do agrupamento génico da globina β e suas regiões regulatórias. LCR (locus control region) é o principal promotor de expressão deste gene. [Adaptado da Figura 1 de (13)].....	17
Figura 2 – Organização do agrupamento génico da globina β e suas regiões regulatórias. LCR (locus control region) é o principal promotor de expressão deste gene [Adaptado de (13)].....	17
Figura 3 – Classificação das patologias relacionadas com a hemoglobina. [Adaptado de (17)].....	18
Figura 4 – Prevalência dos heterozigotos portadores de HbS. [Adaptado de (21)]	19
Figura 5 – Antigos estabelecimentos e aglomerados de escravos negros em Portugal. [Adaptado de Figura 4 de (21)].....	20
Figura 6 – Mecanismos de ação de hidroxíureia. [Adaptado de Figura 1 de (67)].....	31
Figura 7 – Terapias genéticas potenciais para tratamento de drepanocitose. As setas a tracejado indicam o procedimento de células estaminais pluripotentes induzidas (CEPI). [Adaptado da Figura 1 de (176)]	45
Figura 8 – Gene targeting através de recombinação homóloga. [Adaptado da Figura 2a de (176)].....	46
Figura 9 – Representação esquemática da ZFN. [Adaptado da Figura 3a de (176)] ...	47
Figura 10 – Representação esquemática das TALENs. [Adaptado da Figura 3b de (176)]	48
Figura 11 – Representação esquemática da CRISPR/Cas9. [Adaptado da Figura 3c de (176)].....	49

Índice de Tabelas:

Tabela 1 – Diagnóstico de STA (*25,44)	24
Tabela 2 – Prevalência de complicações crônicas de drepanocitose, no Hospital de Santa Maria. [Adaptado da Tabela 2 de (7)]	25
Tabela 3 – Indicações para transfusão de sangue aguda e crônica. [Adaptado da Tabela 1 de (91), texto de (2,88)]	33
Tabela 4 – Características dos agentes quelantes. [Adaptado de (95,96) e da Tabela 1 de (94)]	34
Tabela 5 – Novos medicamentos em estudo para tratamento da drepanocitose. Tendo como alvo quatro processos da fisiopatologia da hemoglobinopatia. [Adaptado de informações e tabelas de (29)]	38

1 Introdução

A drepanocitose (DR) foi, pela primeira vez, reportada por Herrick, em novembro de 1910, descrevendo-a como “corpúsculos de hemácias peculiarmente alongadas e em forma de foice num caso de anemia severa”. (1)

Atualmente, esta doença genética é a hemoglobinopatia e a doença hematológica hereditária mais comum. Devido às suas complicações agudas e crônicas, pode colocar em risco a vida dos doentes e diminuir a sua esperança média de vida. (2,3) Os países pobres continuam a ser os mais afetados (prevalência mundial de 75%), apresentando uma taxa de mortalidade infantil elevada (92%). (4,5) A prevalência e incidência global desta doença irá aumentar, mesmo nos países desenvolvidos, devido ao aumento da sobrevivência destes doentes e aos fenómenos de migração. (5)

Os grandes problemas atuais residem no facto de haver apenas duas terapêuticas modificadores desta doença (hidroxiureia e transfusão de sangue), sendo o transplante a única terapêutica curativa e só aplicável a um específico grupo de indivíduos, prevalecendo, no entanto, incertezas quanto à segurança e à eficácia destas terapêuticas na pediatria.(3,4,6). Em Portugal os dados epidemiológicos encontram-se bastante desatualizados. (7)

Considera-se que é pertinente o acompanhamento do progresso dos estudos de novas terapêuticas nesta área, com especial enfoque na pediatria, certificando a sua segurança e eficácia e verificando sempre se existem dados epidemiológicos mais atuais.

2 Objetivos

Nesta monografia tenciona-se analisar os dados atuais da literatura relativos à DR, especialmente na área pediátrica, nomeadamente, a sua situação epidemiológica em Portugal e a nível internacional; fisiopatologia e complicações associadas; métodos de diagnóstico existentes; terapêuticas instituídas e terapêuticas ainda em estudo.

3 Materiais e Métodos

A presente monografia baseou-se na análise de documentos de informação da literatura, não havendo restrição das datas de publicação, apesar de se ter dado maior importância a publicações mais recentes (a partir do ano 2010, inclusive), em relação ao tema que se incide.

Os termos recorridos para a realização destas pesquisas incluem: “*sickle cell disease review*”, “*sickle cell disease epidemiology*”, “*sickle cell disease epidemiology in Portugal*”, “*sickle cell disease pediatrics*”, “*sickle cell disease children management*”, “*sickle cell disease management guideline*”, “*sickle cell disease diagnostic review*”, “*sickle cell disease new drugs review*”, “*sickle cell disease transplantation review*”, “*sickle cell disease gene therapy*”, drepanocitose rastreio e hemoglobinopatias em Portugal.

A metodologia na procura de informações de literatura foi baseada num conjunto de bases de dados, nomeadamente, *PubMed*; *Cochrane Database of Systematic Reviews*; *Blood Journal*; *National Heart, Lung and Blood Institute* e *Google Scholar*. Foram ainda consultadas circulares normativas disponíveis nos *websites* da Direção-Geral de Saúde e do repositório do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

O *website* de *ClinicalTrials.gov* também foi utilizado para a pesquisa de alguns ensaios clínicos que são reportados nos artigos consultados.

Para a obtenção de conceitos científicos importantes da literatura portuguesa foram consultadas: *Acta Médica Portuguesa*, *Acta Pediátrica Portuguesa* e *Google Académico*.

4 Resultados e Discussão

4.1 Hemoglobina e Hemoglobinopatias

4.1.1 Estrutura da hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é um heterotetrâmero composto por 2 subunidades de globina do tipo alfa e 2 do tipo beta, cada uma ligada a um grupo heme prostético. As principais funções são o transporte de O₂ dos pulmões para os tecidos periféricos e CO₂ dos tecidos para os pulmões. A principal Hb que circula no sangue adulto é a HbA1 (97% da Hb total), sendo composta por 2 cadeias α e 2 β . Também circula HbA2 (2%) constituída por 2 cadeias α e 2 δ , e uma fração residual de HbF (<1%) composta por 2 cadeias α e 2 γ . (8) De salientar que a HbF é a Hb circulante maioritária do recém-nascido (70 a 80% da Hb total), que vai sendo substituída, gradualmente, pelas outras Hb até aos 6 meses de idade (altura em que a HbF perfaz apenas 4 a 5% da Hb total). (9)

4.1.2 Biossíntese da globina do tipo beta ao longo da ontogenia

No cromossoma 11 existe um agrupamento génico (*cluster*) β -globínico que é composto por 5 genes funcionais, cuja expressão é regulada durante o desenvolvimento do indivíduo (Figura 1). (10–12) O gene embrionário *HBE* codifica a globina ϵ , que apenas é expressa no saco embrionário durante o 1º trimestre de gravidez, através da linhagem primitiva de eritrócitos aí existente (Figura 2). (10,13) A partir do 2º semestre de gestação e até ao parto, ocorre o 1º *switch* de Hb em que no fígado fetal expressam-se os genes fetais *HBG1* e *HBG2* e silencia-se o *HBE*, começando a produção dos primeiros eritrócitos definitivos enucleados, a partir de células estaminais e progenitoras. Nestes eritrócitos a molécula β -globínica predominante é a globina γ . (10,14) Após nascimento, há o 2º *switch* em que ocorre o silenciamento dos genes anteriores e expressão dos genes adultos *HBD* e *HBB*, codificando-se as globinas δ e β , respetivamente. (10,11,13,14) Os mecanismos fisiológicos inerentes aos 2 *switching* ainda não estão elucidados, porém descobriram-se alguns co-reguladores transcricionais que poderão estar envolvidos, nomeadamente, *BCL11A* e *LRF*. (14–16)

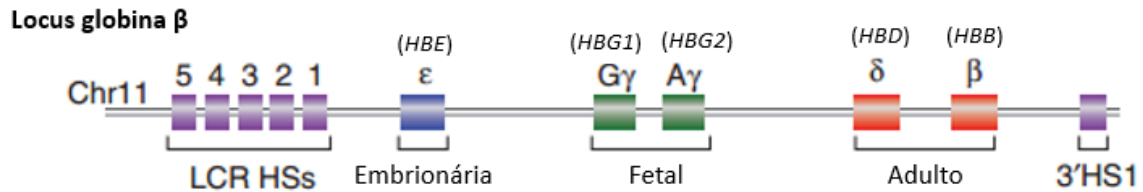


Figura 1 – Organização do agrupamento génico da globina β e suas regiões regulatórias. LCR (locus control region) é o principal promotor de expressão deste gene. [Adaptado da Figura 1 de (13)]

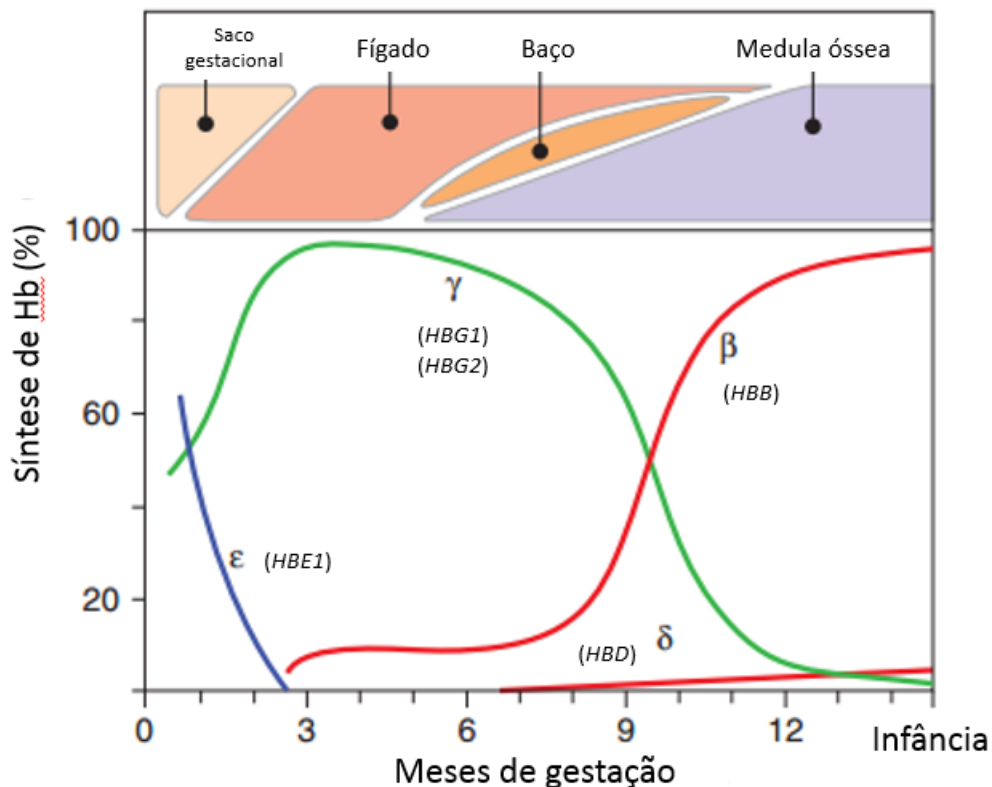


Figura 2 – Organização do agrupamento génico da globina β e suas regiões regulatórias. LCR (locus control region) é o principal promotor de expressão deste gene [Adaptado de (13)]

4.1.3 Genótipos e Fenótipos

As hemoglobinopatias são resultantes de mutações que afetam os genes responsáveis pela síntese das cadeias de globina, podendo ser classificadas em 2 categorias gerais (Figura 3): hemoglobinopatias quantitativas (diminuição ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias de globina – talassemias) e hemoglobinopatias qualitativas (defeito estrutural de umas das subunidades de globina, devido, geralmente, à substituição de um aminoácido). (17,18)

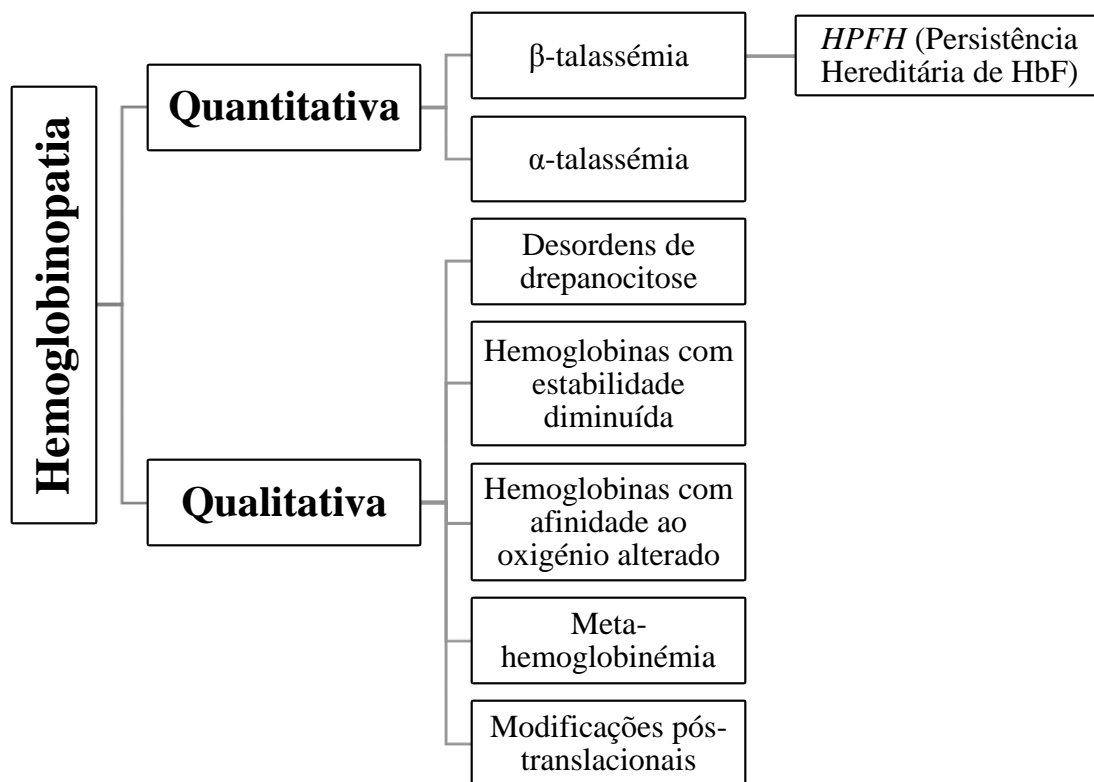


Figura 3 – Classificação das patologias relacionadas com a hemoglobina.
[Adaptado de (17)]

Dentro da DR existem vários termos que classificam os diferentes genótipos e fenótipos que caracterizam esta complexa doença, sendo necessário perceber claramente as suas definições. DR é qualquer condição em que a herança de HbS pode levar a hemácias em forma de foice, por isso, inclui a co-herança de HbS com outro defeito quantitativo ou qualitativo de globina β (HbC ou β^+ -talassemia). Anemia falciforme (AF) define, especificamente, o estado em que apenas predomina HbS, ou seja, homozigotia de HbS (HbSS) ou co-herança de HbS com mutação nula de β globina (HbS β^0 -talassemia). Finalmente, temos os chamados portadores, que herdaram HbS dum progenitor e HbA doutro, pelo que estes indivíduos não têm hemácias em forma de foice e, geralmente, não sofrem de complicações. (3,6,19)

4.2 Epidemiologia

Em 1970, nos Estados Unidos da América (EUA), a DR era considerada uma patologia fatal para a idade pediátrica. Atualmente, passa a ser uma doença crónica para a idade

adulta, graças à evolução da investigação científica e da medicina, em que 95% das crianças que nascem com DR atingem a idade de 18 anos. (20)

Em Portugal, o único estudo epidemiológico de grande escala teve lugar em 1988, recorrendo a amostras de sangue retiradas de 15208 adultos jovens, do sexo masculino, de 3 centros militares – Porto (norte), Coimbra (centro) e Setúbal (sul) – resultando na seguinte prevalência geográfica (figura 4)

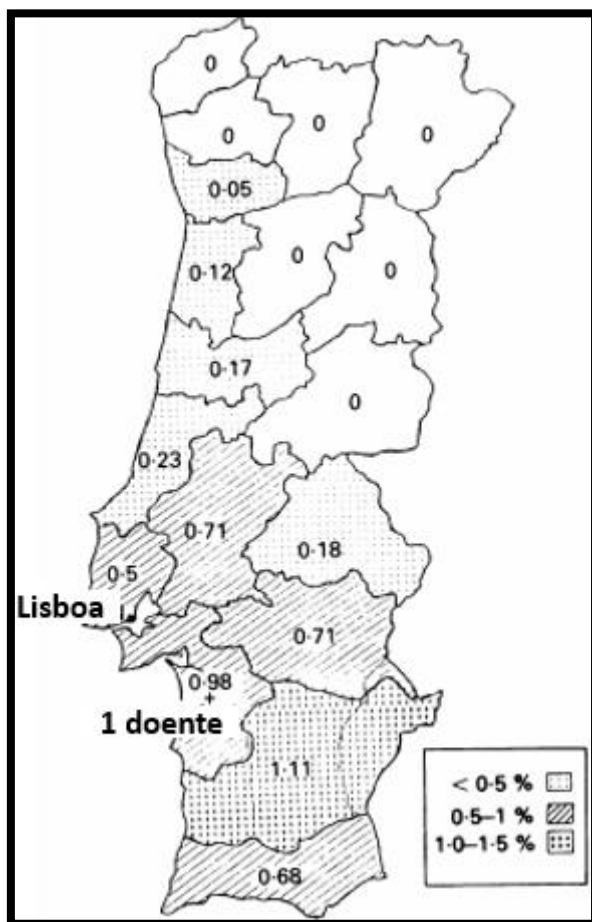


Figura 4 – Prevalência dos heterozigotos portadores de HbS. [Adaptado de (21)]

Verificou-se que a prevalência global de portadores era de 0-1% no Norte e superior a 2% em 3 distritos do Sul. Estes valores eram superiores à prevalência de HbS (0,32%). Esta distribuição assimétrica, entre norte e sul do país, pode ser explicada pela predominância da importação de escravos africanos para trabalhar nos arrozais dos estuários dos rios do Sul, em especial dos rios Tejo e Sado (figura 5). (21) Foi também observado que os 3 principais haplótipos presentes em portugueses caucasianos de descendência africana são o Bantu, Benim e Senegalense. (22,23) De notar, que a

malária era frequente nos vales dos rios Sado, Guadiana e Tejo, dando uma vantagem de sobrevivência aos portadores de HbS, o que permite explicar que se tenha mantido e até aumentado a frequência local dos portadores desta hemoglobinopatia. (21)

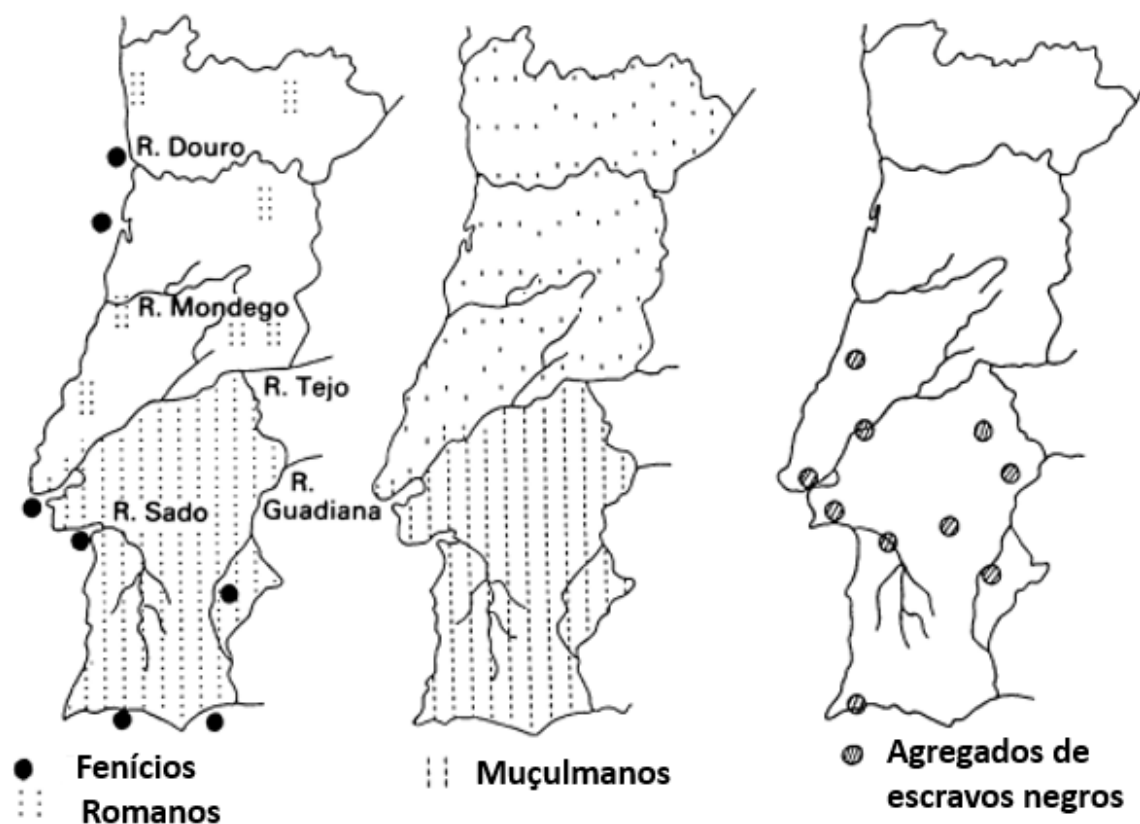


Figura 5 – Antigos estabelecimentos e aglomerados de escravos negros em Portugal. [Adaptado de Figura 4 de (21)]

Em 2011 foi divulgado, no encontro “Drepanocitose em Debate”, uma tentativa de registo nacional de doentes com DR, a partir de dados de vários centros hospitalares de Portugal. De um total de 590 registos, o genótipo HbSS foi o mais frequente (75,9%), ficando em segundo lugar o HbS-talassemia (5,1%) e HbSC (5,1%). E houve maior número de registos na faixa etária de 6 a 25 anos (48,8%). (8)

4.3 Drepanocitose

4.3.1 Etiologia

A DR é causada por uma única mutação que substitui o segundo nucleótido do 6º codão do gene *HBB*, resultando na mudança do nucleótido adenina (A) em timina (T) e, consequentemente, na substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina na 6ª

posição da cadeia de globina β levando à substituição da HbA1 por Hb S – (HBB):c.20A>T (p.Glu6Val). (24,25)

A DR é uma doença hereditária, transmitida aos descendentes de forma autossômica recessiva. Seguindo a lei de Mendel, se um dos progenitores for portador do gene *HBB* HbS e o outro portador doutra variante patogénica do gene *HBB* (ex: HbS, HbC, β -talassémia), cada criança terá 25% de probabilidade de ser afetada, 50% de não ser afetado e ser portador, 25% de não ser afetado e não ser portador. (6)

4.3.2 Fisiopatologia

Hemácias que contenham HbS ou HbS e outras hemoglobinopatias (ex: HbC) encontram-se alteradas, sofrendo hemólise mais cedo do que as hemácias normais. (26) Isto deve-se, teoricamente, a vários mecanismos fisiopatológicos, nomeadamente moleculares e celulares. Devido à HbS, as células falciformes têm apenas uma esperança de vida de apenas 1/10 daquela das hemácias normais. (12)

Os mecanismos moleculares são intensificados quando concentração de HbS nas hemácias chega perto de 30 g/dL, formando-se géis semissólidos dentro da célula. (27) Uma das características fundamentais da HbS é a sua insolubilidade quando em estado desoxigenado, conduzindo à formação de polímeros que se agregam em fibras tubulares, que deformam, alongam e rigidificam a hemácia e, conseqüentemente, lhe dão a forma de foice característica desta doença. Por outro lado, em estado oxigenado, estes polímeros desintegram-se. (28,29) De notar que a própria polimerização de HbS reduz a afinidade desta Hb para o O₂, estabilizando, ainda mais, o estado desoxigenado. A HbS desoxigenada copolimeriza-se a si mesmo com grande facilidade, menos com HbA e ainda menos eficazmente com HbF. (3) A falciformação é reversível através de reoxigenação dos eritrócitos, levando à quebra de polímeros de HbS e restaurando a forma normal dos eritrócitos. (30) Daí um dos objetivos terapêuticos ser o aumento de HbA (transusão sanguínea) e o de HbF (hidroxiureia) in vivo, de forma a inibir a formação de polímeros e de géis. (3)

Existem estudos recentes que evidenciam que o stress oxidativo e inflamação estão associados à fisiopatologia desta doença, ou seja, hemácias falciformes e micropartículas derivadas de hemácias iniciam uma cascata que ativa os neutrófilos, monócitos e plaquetas que, por sua vez, secretam citocinas e quimiocinas. Por outro

lado, a hemólise crónica leva a libertação de Hb livre que tem afinidade para o NO (potente vasodilatador), diminuindo, assim, o NO circulante, o que favorece a vasoconstrição. Isto tudo potencia a inflamação, disfunção endotelial e propicia, danos nos órgãos. (3,31,32)

Relativamente aos mecanismos celulares, um dos mais importantes é a adesão. A polimerização de HbS altera a membrana celular da hemácia, afetando os seus componentes lipídicos e proteicos de tal forma que interagem anormalmente com células brancas, plaquetas e endotélio vascular. A alteração lipídica da membrana é evidenciada pelo aumento de micropartículas de hemácias (perdas de lípidos), o que aumenta a exposição de fosfatidilserina de carga negativa na face externa da membrana – pensa-se que amplia a conversão de protrombina em trombina, favorecendo a taxa de eventos trombóticos. (33) Mudanças proteicas incluem a estimulação da produção de várias moléculas de adesão (selectinas E e P, VCAM) e ativação de recetores de adesão (incluindo BCAM/Lu, ICAM-4 e CD44), tornando estas hemácias 2-10 vezes mais aderentes ao endotélio, o que contribui ainda mais para as patologias vasculares. (29,34,35)

Outro mecanismo celular é a hemólise (intra e extravascular), propiciada pelos danos da membrana celular. A hemólise intravascular é favorecida pela fragmentação de uma membrana celular já danificada, através de forças de cisalhamento geradas pela passagem dos eritrócitos deformados pelas microvasculaturas. A hemólise extravascular é mediada pelo baço e pelos macrófagos e monócitos tecidulares, que reconhecem os eritrócitos danificados e os removem do sangue. Devido a hemólise, aumentam os níveis de Hb livre e, conseqüentemente, diminuem os níveis de NO. (3,24)

Estes múltiplos mecanismos fisiopatológicos culminam num dos principais eventos que define a drepanocitose, nomeadamente, a vaso-oclusão. (3)

4.3.3 Manifestações Clínicas

Esta doença sistémica tem o potencial de afetar aguda e/ou cronicamente numerosos órgãos do organismo, que podem levar a morbilidade e mortalidade prematuras, sendo necessário ao longo da vida destes indivíduos atenção médica imediata. (2,3) As manifestações, em crianças com AF, tipicamente apenas aparecem após os 6 meses de idade, altura em que os níveis de HbF começam a ser baixos. (36,37)

4.3.3.1 Agudas

A sequestração esplênica caracteriza-se por aumento agudo do baço, com Hb 2g/dL abaixo do valor normal e uma trombocitopenia leve a moderada também pode estar presente. Esta manifestação ocorre em 10-30% das crianças com DR, afetando principalmente os de 6 meses a 3 anos de idade. Assim, muitas crianças com AF, no decurso do seu 1º ano de vida, terão baço disfuncional, auto-enfarte completo e atrofia devido a isquemia do baço na idade de 5 anos. Logo, a função esplênica é deficiente ou inexistente nestes casos. (2-4,6)

Tendo o baço comprometido, estas crianças têm maior risco a infecções (meningite) e septicemia (38,39) Estas infecções podem surgir logo no 1º ano de vida. A taxa de mortalidade é elevada, ainda mais quando os doentes têm carência de imunidade humoral contra serotipos específicos de pneumococos. (2) Historicamente, a sepsis por *Streptococcus pneumoniae* foi a causa de morte infantil mais comum nos primeiros 3 anos de vida. (6) Há genótipos menos suscetíveis a infecções (HbSC, HbSβ⁺-talassemia), pois a função esplênica é normal ou minimamente afetada, mas todos os genótipos irão ter risco acrescentado com o avançar da idade. (4)

A dactilite (dor ou inchaço das mãos ou pés) é uma manifestação frequente nos bebês e crianças. Usualmente afeta a parte dorsal das extremidades, e envolve de 1 a 4 membros. (6) Existem estudos que a evidenciam como um fator de risco preditivo de futuras manifestações mais severas. Um dos estudos foi realizado em Portugal, no Hospital de Santa Maria, tendo-se verificado que 4 dos 44 doentes que tiveram dactilite antes do 1º ano de vida, tinham um número médio de hospitalizações mais elevado e de complicações crônicas. (6,7)

A crise vaso-oclusiva (CVO) é característica da DR e traduz-se por dor aguda severa. (4) É a morbilidade mais recorrente, perfaz a maioria dos casos de admissão hospitalar e também de ausência escolar e ao trabalho. (40,41) Quase todos os indivíduos com DR são sujeitos a estas crises durante a sua vida e a 1ª crise pode ser logo aos 6 meses de idade. (4,42-44) O diagnóstico é difícil, pois é facilmente confundido com outras complicações associadas à dor (sequestração esplênica, enfarte, obstipação de toxicidade por opioides). Os genótipos de AF sofrem mais frequentemente, ao passo que os portadores tipicamente não sofrem. De notar, que os indivíduos com mais de 3

hospitalizações no mesmo ano, devido a crise vaso-oclusiva, estão sob risco aumentado de morte prematura. (40,42,45–48)

Uma das complicações que afeta 35% dos rapazes e homens é o priapismo, que se traduz numa ereção involuntária, sustentada e dolorosa durante ≥ 4 horas. Usualmente é um tipo de isquémia de baixo fluxo, caracterizado por dor e glândulas moles. Sem diagnóstico e tratamento poderá levar a impotência masculina. (49,50)

A Síndrome Torácica Aguda (STA) é um processo complexo que pode surgir em qualquer momento devido a múltiplas etiologias. (2,51) É uma das complicações agudas mais comuns e graves da DR, sendo a 2ª causa de admissão hospitalar para pediatria e adultos e, ainda, a causa de morte mais comum na DR. (52–54) A frequência de STA aumenta em doentes com asma ou que tiveram eventos prévios de STA. A definição clínica de STA varia na literatura, porém o seu diagnóstico clínico só é possível se cumprir os 2 critérios seguintes (Tabela 1):

Tabela 1 – Diagnóstico de STA (*25,44)

Diagnóstico de STA	
Radiografia torácica	Novo infiltrado pulmonar envolvendo pelo menos um segmento pulmonar completo que não é consistente com o aparecimento de atelectasia. *Nas crianças o envolvimento centra-se mais no lobo pulmonar superior ou médio.
Sinais e sintomas (1 ou mais)	Dor torácica Temperatura $> 38,5^{\circ}\text{C}$ Taquipneia Chiado Tosse Ou aparecimento de aumento de esforço respiratório (retrações) Hipoxemia relativo a valores normais *Febre (usual em crianças)

A causa específica de STA não é, muitas vezes, fácil de distinguir, todavia existem já várias etiologias estudadas, nomeadamente, infeção bacteriana (a mais comum na pediatria, também há infeção viral), embolismo lipídico da medula óssea, agregados intrapulmonares de células falciformes, atelectasia, ou edema pulmonar. (4,54,56) Geralmente estes doentes melhoram num intervalo de dias mas, alguns, desenvolvem rapidamente falha respiratória envolvendo ou não outros órgãos, tais como, cérebro, rins e fígado. Esse envolvimento denomina-se síndrome da disfunção múltipla de órgãos. (2,57)

4.3.3.2 Crónicas

As descrições de complicações crónicas na pediatria são inferiores às dos adultos, uma vez que nesta área os profissionais de saúde preocupam-se mais com as complicações agudas, que podem ser fatais. O único estudo, encontrado, com resultados reportados relativamente a complicações crónicas em Portugal, foi o de Hospital de Santa Maria (Tabela 2). (7)

Tabela 2 – Prevalência de complicações crónicas de drepanocitose, no Hospital de Santa Maria. [Adaptado da Tabela 2 de (7)]

Complicações crónicas	Nº de doentes afetados (%)
Ligeira dilatação do ventrículo esquerdo	21 (47.7)
Anormalidades na função respiratória	19 (43.2)
Microlitíase/Colelitíase	18 (40.9)
Velocidade de fluxo das artérias cerebrais aumentado	14 (31.8)
Enurese	3 (6.8)
Puberdade tardia	3 (6.8)
Anormalidades ósseas	3 (6.8)
Retinopatia proliferativa	2 (4.6)
Úlcera nas pernas	2 (4.6)
Priapismo recorrente	1 (2.3)

Segundo o estudo de Silva et al. (7), as anormalidades na função respiratória são umas das complicações mais prevalentes, nomeadamente, a hipertensão pulmonar (HP). A HP define-se como uma elevação da média da pressão de repouso da artéria pulmonar (≥ 25 mmHg), determinada pela cateterização do coração direito. (58) A etiologia mais frequente de HP é a anemia hemolítica crónica. (59) Os principais sintomas de HP incluem falta de ar durante atividades de rotina, fadiga, letargia, dor torácica, palpitações, síncope, edema periférico e falta de apetite. (60)

A dor é considerada crónica quando se prolonga por mais de 3 meses. (4) A dor incutida pela DR frequentemente evolui para cronicidade, resultando numa pobre qualidade de vida. (44,61) O tratamento antecipado e agressivo da dor aguda pode reduzir essa evolução. (62) Segundo estudos epidemiológicos, a dor crónica afeta cerca de 10% de crianças com DR. (63) Os medicamentos usados na terapêutica incluem anti-inflamatórios não esteroides, opióides, antidepressivos e anticonvulsivantes.

A necrose avascular (também conhecida como necrose asséptica, osteonecrose ou necrose isquémica) é uma síndrome de morte óssea devido a comprometimento do suprimento sanguíneo. Isto ocorre em cerca de 10% dos indivíduos com DR, sendo a articulação coxo-femoral a mais afetada (esta área do corpo tende a desenvolver dor crónica). Indivíduos de genótipos HbSS- α -talassémia e HbS β^0 -talassémia estão em maior risco de contraírem esta complicação em idades mais jovens. (2–4,6)

A úlcera nas pernas é uma complicação comum, segundo os dados de *Cooperative Study of Sickle Cell Disease* (CSSCD), nos EUA existem úlceras nas pernas ativas em 2,5% de 2075 indivíduos com ou mais de 10 anos de idade (22% dos quais compreendem os 10 e 20 anos de idade) e nenhum em 1770 indivíduos com menos de 10 anos de idade. (64) Segundo o CSSCD identificam-se 5 fatores que podem afetar o risco de sofrer de úlcera nas pernas: sexo masculino, idade, trauma, infeção e anemia severa. É menos comum indivíduos com deleção do gene α , alto nível de Hb total e alto nível de HbF, sofrerem de úlcera nas pernas. O tratamento desta complicação inclui desbridamento da ferida, preparações tópicas (butirato de arginina, por exemplo), antibióticos tópicos ou sistémicos. (4)

4.3.4 Diagnóstico e Rastreio

O diagnóstico e rastreio, antes do início da sintomatologia, são determinantes para identificação dos doentes e permitir a implementação de programas terapêuticos e medidas de prevenção e de educação, de modo a assegurar e melhorar a qualidade de vida destes doentes. (6)

Segundo a normativa 08/DSMIA de 07/09/2004, em Portugal preconiza-se a “detecção e informação precoce, preferencialmente pré-concepcional, de adultos portadores (heterozigotos), a identificação e o aconselhamento genético dos casais em risco, e, quando necessário, a oferta de diagnóstico pré-natal”. De salientar que, “o rastreio das hemoglobinopatias não deve ser realizado a crianças, salvo em situações clínicas que o justifiquem.” (65)

Isto significa que em Portugal é proposto o rastreio pré-natal (RPN) a todas as mulheres em idade reprodutiva, particularmente, nas consultas de planeamento, pré-concepcional ou, com carácter de urgência, na 1ª consulta da gravidez. Este rastreio é **dirigido** às áreas de maior prevalência de hemoglobinopatias. O rastreio segue a seguinte metodologia: (65)

- “anemia e/ou microcitose (Volume Globular Médio (VGM) <80 fL) e/ou hipocromia (Hemoglobina Globular Média (HGM) <27 pg), *após exclusão de sideropenia*”. “*Se se tratar de uma grávida, (não aguardar pela investigação de sideropenia) solicitar, de imediato, a pesquisa de hemoglobinopatias nos dois membros do casal*”.

ou

- “hemoglobina elevada, acima dos parâmetros normais para a idade, sexo e estado de gravidez, sem história de patologia associada ou hábitos tabágicos acentuados”

ou

- “parâmetros hematológicos normais, mas a família da mulher (ou do parceiro) é oriunda dos distritos com maior prevalência de Hb S – Beja, Faro, Santarém e Setúbal – ou das comunidades de imigrantes atrás referidas, *suspeitar de Hemoglobinopatia e pedir o estudo das hemoglobinas (electroforese de Hbs com quantificação de HbA2 e F).*”

De salientar, os 2 primeiros tópicos do rastreio de 2004 correspondem aos parâmetros para despiste de talassemias. A DR é uma hemoglobinopatia qualitativa, associada a anemia hemolítica, normocítica e normocrômica, ou seja, os indivíduos portadores do gene mutante de globina β têm hemograma normal (correspondendo ao terceiro tópico do rastreio).

O RPN de 2004 é uma questão em debate, pois como medida de prevenção primária, tem algumas limitações que levam a que o número de pessoas rastreadas seja menor do que o desejável, nomeadamente: (8)

- “Dificuldade nas consultas médicas em identificar os casais de risco”, pois o “correto reconhecimento implica uma anamnese familiar cuidada, dirigida e tendencialmente morosa”
- Na normativa não está definido “até que grau geracional se deve investigar a origem geográfica dos antecessores”, e “as pessoas podem não conseguir fornecer informação fidedigna acerca das suas origens familiares e/ou do parceiro”
- Não tem em conta os fluxos migratórios internos do país
- Inexistência de dados epidemiológicos atualizados como auxílio

Tendo em conta estas limitações, existem vários autores que defendem um modelo de rastreio mais universal e inclusivo, sendo assim vantajoso a inclusão de rastreio neonatal de hemoglobinopatias no leque de patologias rastreadas pelo Programa Nacional de Diagnóstico Precoce (PNDP), uma vez que poderia ser uma resposta possível relativamente às gravidezes inadequadamente vigiadas e poderia permitir evitar as complicações de um diagnóstico tardio, que por vezes tornam-se fatais. O facto de o rastreio neonatal não ter sido ainda implementado deve-se a um estudo em crianças na Maternidade de Alfredo da Costa, na década de 90. O estudo envolveu colheita de sangue de cordão umbilical (CU) de 400 recém-nascidos, independentemente de qualquer seleção. Identificaram-se seis crianças portadoras de HbS (1,5%), das quais quatro eram de origem africana, não se identificando nenhum caso de doença. Fundamentando-se nestes dados os “autores deste estudo consideraram não haver justificação, em termos custo-benefício, na aplicação de rastreio neonatal de drepanocitose a toda a população.” Consideraram apenas o rastreio dirigido à população em risco. (8,66)

Em 2015, Centros Médicos de Angola e Moçambique contratualizaram com o INSA estudos de rastreio neonatal a bebés nascidos no estrangeiro, em que seis estudos incluíram o rastreio de DR. (67) Neste ano de 2017, o PNDP estabeleceu como um dos seus objetivos, para os próximos três anos, o “Início de um estudo piloto para o rastreio neonatal de hemoglobinopatias, nomeadamente da drepanocitose”, (68)

Existem várias metodologias que podem ser usadas para a caracterização analítica do fenótipo: hemograma (eritrograma com índices eritrocitários), técnicas electroforéticas, técnicas cromatográficas, e estudos funcionais da Hb.

A focagem isoeletrica (FIE) em gel de poliacrilamida é o método mais usado nos programas de rastreio do EUA, e permite a separação de proteínas de acordo com o seu ponto isoeletrico. A FIE como método de rotina, tem uma resolução relativamente alta, fornece uma plataforma de rastreio de alto rendimento e por isso é frequentemente usado no rastreio neonatal. Todavia, é um método menos quantitativo que a cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC). A tecnologia FIE capilar permite a separação de amostras muito pequenas, quantificação e automatização de amostragem. (6)

A HPLC é uma técnica cromatográfica capaz de separar facilmente algumas proteínas que não poderiam ser resolvidas por outros métodos. A HPLC quantifica com precisão e exatidão Hb normais e variantes de Hb em baixas concentrações, permitindo diferenciar a HbS β^+ -talassémia da HbAS (portador de HbS), bem como descrição quantitativa de componentes heterozigotos como a HbS-HPFH. E HbSC. Todavia, não tem capacidade para distinguir definitivamente a HbS β^0 -talassemia da HbSS, sendo que neste caso seria necessário um estudo genético ou estudos laboratoriais adicionais. (6)

Um dos estudos funcionais de Hb mais usado é o teste de solubilidade, que aproveita da insolubilidade relativa da HbS desoxigenada em soluções de alta molaridade. HbS em hemolisados precipita na solução teste, ao passo que outros componentes sanguíneos continuam suspensos. Os principais objetivos do teste de solubilidade são: (6)

- Rastreio rápido e de baixo-custo para deteção da presença de HbS, antes de investir em testes de diagnóstico definitivos

- Estimativa emergente da probabilidade de existir uma hemoglobinopatia clinicamente significativa (se combinado com contagem de células, esfregaço de sangue e contagem de reticulócitos)

O teste de solubilidade nunca poderá ser usado no diagnóstico definitivo, devido a várias razões: (6)

- Não diferencia o doente com DR (HbSS) do portador de HbS (HbAS)
- Falsos positivos foram reportados
- Altos níveis de HbF podem causar falsos negativos em bebês com DR
- Pode falhar na detecção de algumas formas clínicas significativas de DR (por exemplo, HbSC)

4.3.5 Abordagens Terapêuticas e suas complicações

4.3.5.1 Hidroxiureia

A hidroxiureia (HU) é um agente antineoplásico usado, antigamente, na quimioterapia de tumores sólidos e de leucemias. (69) A HU é o único medicamento aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), desde 1998, para o tratamento da DR com o objetivo de reduzir a frequência de crises dolorosas e a necessidade de transfusão de sangue (TDS) em adultos com AF. (69,70) Na Europa, só a partir de 2006, é considerada como um medicamento órfão, para tratamento da DR. Todavia, segundo o *European Public Assessment Reports* (EPAR), tem como único intuito a “prevenção de crises dolorosas vaso-oclusivas recorrentes incluindo a síndrome aguda do tórax em adultos, adolescentes e crianças com mais de 2 anos de idade que sofrem de Anemia das Células Falciformes sintomática”. (71,72)

O mecanismo de ação específico da HU ainda não é totalmente conhecido, contudo sabe-se que os seus benefícios na terapêutica são multifatoriais (Figura 6). O mecanismo primário consiste na inibição reversível da ribonucleótido redutase, requerida para síntese e reparação de ácido desoxirribonucleico (ADN), levando à diminuição de desoxirribonucleótidos trifosfatos e impedindo a progressão da fase S da divisão celular. (73–75) Isto causa uma paragem temporária da eritropoiese e aumento de HbF, por recrutamento de uma população de precursores eritrocitários que mantêm a sua capacidade de continuar a síntese de cadeia γ . (3,72,76–78) O aumento de HbF dentro das hemácias inibe a polimerização intracelular de HbS e previne, assim, a

falciformação das hemácias. (69,72) Aliás, estas hemácias ao terem HbF têm maior Volume Corpuscular Médio e são mais deformáveis (melhor reologia). (69,79)

Este fármaco permite o aumento de NO, que estimula transcrição de genes (*BCL11A*) que sincronizam com a síntese de HbF. (80,81) Aliás, o NO pode melhorar a circulação sanguínea pulmonar e reduzir o risco de hipertensão pulmonar na DR. (82–84)

Finalmente, pensa-se que a HU reduz a inflamação crônica e risco trombótico, através de reduções no número de neutrófilos e de plaquetas e pela diminuição da expressão de moléculas de adesão na superfície celular das hemácias. (85,86)

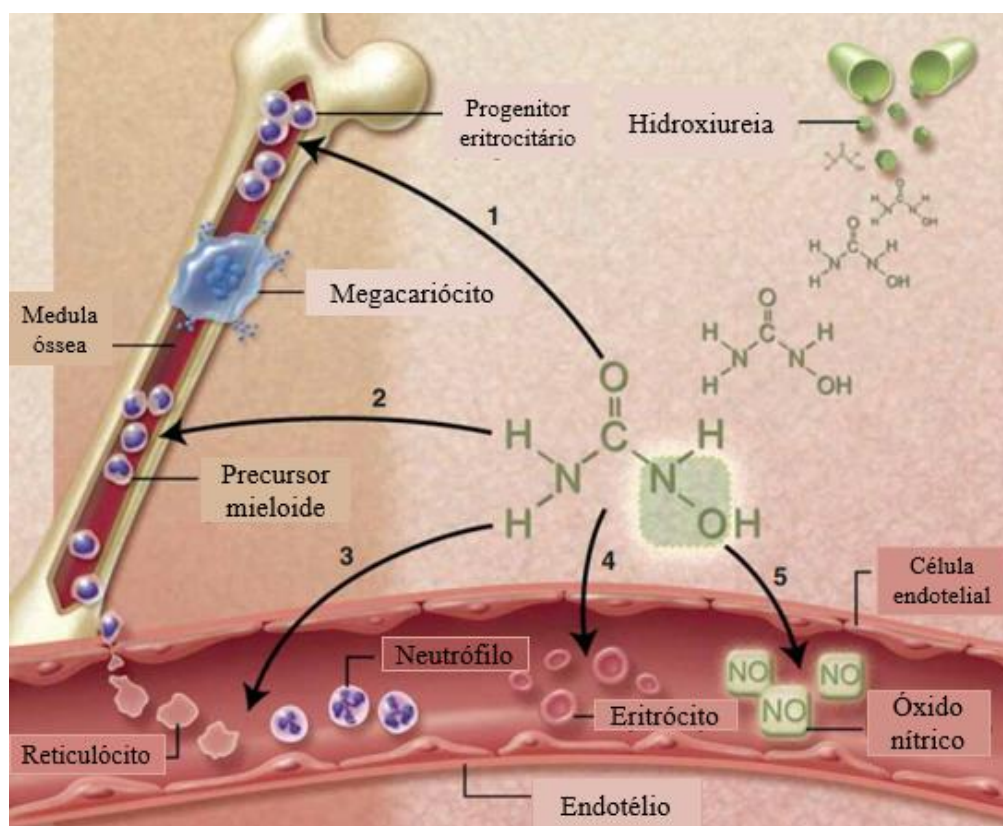


Figura 6 – Mecanismos de ação de hidroxiureia. [Adaptado de Figura 1 de (69)]

O efeito antineoplásico da HU advém da inibição imediata da síntese de ADN, ao atuar como um inibidor da ribonucleotídeo redutase (RNR), sem interferir com a síntese de proteínas ou de ácido ribonucleico. (72,76) Por esta razão, há a teoria de que, em certas condições, HU pode induzir efeitos teratogénicos (76), apesar de a HU ter sido usada por mais de 30 anos nos doentes da DR sem observação de algum aumento de risco de malignidade. E o efeito adverso mais comum de HU é supressão da medula óssea. (87) Devido a estas razões, e à pouca experiência dos médicos, a HU é subutilizada na

clínica. Infelizmente, cerca de 25% dos doentes com anemia falciforme não respondem à HU, e alguns doentes sofrem efeitos secundários graves. (88)

Os estudos de BABYHUG (*multi-center randomized, placebo-controlled trial of HU in young children with SCA*) em doentes pediátricos, de idade a partir dos 9 meses de idade, com AF, demonstraram que os resultados do tratamento com HU são similares aos dos adultos (redução de crises de dor, de STA e de necessidade de TDS). Por esta razão, o “2014 NHLBI Evidence Based Management Guidelines for Sick Cell Disease” recomenda que todos os doentes pediátricos de 9 meses de idade ou mais com AF devem ser tratados com HU, independentemente da frequência ou severidade das complicações. (2,89) As mesmas crianças de BABYHUG estão a entrar na adolescência, pelo que o seu crescimento, desenvolvimento e função dos órgãos estão a ser monitorizados em BABYHUG 2 (NCT01783990). (89)

4.3.5.2 Transfusão de sangue

A TDS como método terapêutico tem três objetivos principais. Primeiro, aumentar os níveis de HbA normal, melhorando a anemia. Segundo, reduzir a percentagem de hemácias circulantes contendo HbS, prevenindo a falciformação e reduzindo as complicações resultantes da vaso-oclusão e aumento da concentração de HbA. Terceiro, ao melhorar a oxigenação tecidual, suprime a produção endógena de drepanócitos (2,3,90) Estes objetivos podem ser melhor atingidos se os níveis de HbS for diminuído para inferior a 30% e o nível de Hb total não for superior a 10%. (91,92)

No geral, a TDS pode ser usado de modo agudo, como primeira linha de tratamento em complicações de risco de morte, ou crónico, como parte dum programa de prevenção de ocorrência ou recorrência de complicações da DR (tabela 3). O objetivo comum de qualquer profilaxia por TDS é manter concentração de HbS abaixo de 30% de Hb total. (3,4,93)

Existem 2 métodos de administração de TDS: transfusão simples (TS) e transfusão de permuta parcial (TPP) manual ou automatizada. A diferença entre os 2 reside no facto de na TPP além de se administrar o sangue dador, também haverá remoção do sangue do recetor, antes e/ou depois da administração. A TPP é mais vantajosa pois, nomeadamente, permite reduzir mais rápida e eficazmente a concentração de HbS, não há aumento do hematócrito pelo que não ocorre hiperviscosidade sanguínea e minimiza o risco de sobrecarga de ferro. (3,4,90)

TDS tem riscos associados, podendo conduzir a várias complicações secundárias, tais como transmissão de doenças infecciosas, aloimunização e sobrecarga de ferro. (2,89,94) Os bancos de sangue realizam rastreios para deteção de microorganismos patogénicos transmissíveis por via sanguínea, todavia podem falhar, e o vírus da hepatite C é o mais preocupante. (2) A aloimunização, que acontece em 6 a 85% dos doentes (4), ocorre se as hemácias do dador têm um perfil antigénico diferente das do indivíduo recetor, conduzindo a uma reação imunológica pelo recetor contra esse perfil. (2,3) O sangue do dador introduz 200 a 250 mg de ferro, tendo em conta a inexistência de mecanismos fisiológicos de eliminação deste excesso ferro, irá acumular-se no sangue recetor – sobrecarga de ferro (SF) – e afetará a normal função dos órgãos – hemossiderose. (2,3)

Tabela 3 – Indicações para transfusão de sangue aguda e crónica. [Adaptado da Tabela 1 de (93), texto de (2,90)]

Complicações agudas	Complicações crónicas
Acidente vascular cerebral (AVC)	Prevenção de AVC primário Prevenção de AVC secundário
STA sintomática severa	
Preparação pré-operatória (atingir nível de Hb igual a 10 g/dL)	
Sequestração esplénica	
Enfarte agudo	
Anemia aguda sintomática	
Disfunção múltipla de órgãos aguda	

4.3.5.3 Agentes quelantes

O diagnóstico de SF em pediatria envolve a documentação histórica de TDS ≥ 200 mL de hemácias/kg e confirmação através de testes sanguíneos específicos (nível de ferritina sérica, biópsia do fígado com quantificação de ferro, MRI 2). (95) A SF afeta principalmente o fígado, coração e sistema endócrino. Está associada à produção de radicais livres que atacam os tecidos resultado em toxicidade cardíaca hepática, disfunção endócrina e toxicidade hepática. (96)

Os agentes quelantes ligam-se ao ferro por ligações covalentes e permitem a sua eliminação pela urina e/ou fezes. Os agentes recomendados são desferroxamina, deferasirox e deferiprona (tabela 4). De momento, na Europa apenas existe os 2 últimos.

Tabela 4 – Características dos agentes quelantes. [Adaptado de (97,98) e da Tabela 1 de (96)]

Propriedades	Desferroxamina	Deferasirox	Deferiprona
Via de administração	Subcutânea, intravenosa	Comprimido ou solução oral	Comprimido para suspensão oral
Dose usual	20-40 mg/kg/dia em 8-24 horas, 5 dias por semana	75-100 mg/kg/dia em 3 doses divididas diariamente	Dose inicial 20 mg/kg Máximo 40 mg/kg/dia
Excreção	Urinária, fecal	Maioritariamente urinária	Fecal
Indicações	Tratamento de SF crónica devido a anemias dependentes de transfusão (e para tratamento de intoxicação aguda de ferro)	Tratamento de SF em talassemia major quando a desferroxamina é contraindicada ou inadequada	Tratamento de SF transfusional em β -talassemia major, idade ≥ 6 anos. Quando a desferroxamina é inadequada ou contraindicada em doentes com outras anemias, idade 2-5 anos. Síndromes talassémicas não dependentes de transfusão, idade ≥ 10 anos
Considerações de idade	Não recomendado a crianças <3 anos, com baixa carga de transfusão	Dados limitados ou inexistentes em crianças <6-10 anos	Estudado em crianças a partir de 2 anos de idade

4.3.5.4 Profilaxia antibiótica e imunização

A deficiência da função esplénica torna as crianças vulneráveis a infecções pneumocócicas. É recomendada uma estratégia terapêutica de prevenção de três passos: 1 – profilaxia com penicilina, duas vezes por dia, desde idade inferior a 3 anos de idade até aos 5 anos; 2 – vacinação contra pneumococos e outros agentes patogénicos encapsulados, contra *Haemophilus influenzae* tipo B, vírus da hepatite B, e administração doutras vacinas *standard*; 3 – educação dos doentes e familiares acerca da necessidade de procurar imediatamente ajuda médica em eventos de febre. (4,38,39,99–101) Estas medidas permitiram reduzir significativamente a incidência de septicémia e meningite na pediatria. (102)

4.3.5.5 Terapêutica da dor

Na pediatria a dor advém principalmente de episódios vaso-oclusivos. Em crianças jovens por volta de 6 meses de idade, estes episódios manifestam-se como dactilite, e em crianças mais velhas como dores musculoesqueléticas. (62,89,103)

A terapêutica recomendada é o uso de analgésicos opióides e/ou de anti-inflamatórios não esteroides por via oral, no ambulatório. No caso das dores continuarem, apesar do uso de terapêutica oral, pode-se recorrer à via intravenosa num centro clínico. (4,89)

4.3.5.6 L-glutamina

No dia 7 de julho de 2017, a FDA aprovou a L-glutamina, sob a forma farmacêutica de pó oral, para reduzir as complicações agudas da drepanocitose em adultos e crianças a partir dos 5 anos de idade. (104) O mecanismo de ação deste novo fármaco ainda não é totalmente compreendido. Pensa-se que a L-glutamina possa melhorar o potencial redox de NAD em drepanócitos, através do aumento da biodisponibilidade de glutathione reduzida. (105)

4.3.5.7 Terapêutica curativa

A única medida terapêutica existente na clínica para curar a DR é a transplantação de células estaminais hematopoiéticas (TCEH) (2,3,6,89,106), também chamada simplesmente de transplantação hematopoiética. (107) Os transplantes *matched sibling donor* (MSD) com os perfis de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) compatíveis são os mais usados na clínica atual, e têm as mais altas taxas de sobrevivência global (TSG) – superior a 90% – e de sobrevivência livre de doença (TSLD) – 82% a 100%.

Apresentam também as mais baixas taxas de rejeição de enxerto – 8 a 18% – e de doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) – 6 a 35%. (108) Os resultados de TCEH são melhores quando realizados em doentes jovens (inferior a 16 anos de idade) antes das transfusões crónicas serem necessárias, na ausência de comorbilidades e de danos nos órgãos. (109)

Apesar destas ótimas taxas, o transplante implica a utilização de regimes mieloablativos, que estão associados a toxicidades substanciais em vários órgãos, especialmente nas gónadas podendo levar à infertilidade do doente e constituindo uma grande preocupação para os pais e familiares. (110–112) Devido a estes problemas, estão a ser estudados novos regimes menos agressivos e, num estudo obtiveram-se taxas semelhantes às referidas anteriormente: TSG de 93%; TSLD de 90,7%; DECH aguda (DECHa) de 23% e DECH crónica (DECHc) de 13%. (113) Felizmente, já foram reportados nados vivos em indivíduos pós-TCEH; e também foram reportadas gravidezes bem-sucedidas em indivíduos que optaram pela colheita e preservação dos seus tecidos de espermatogénese ou do ovário, com posterior transplante dos mesmos, após TCEH. (114,115) Todavia, o número de estudos de fertilidade é limitado, sendo necessário estudos contínuos dos resultados após TCEH a longo prazo e de estudos para avanço da preservação da fertilidade. (112)

Uma outra toxicidade importante proveniente dum transplante é a DECH.

O maior obstáculo de TCEH é a fonte restrita de dadores. (106) Globalmente, estima-se que menos de 30% dos indivíduos com DR tenham irmãos imunocompatíveis e menos de 60% tenham dadores não relacionados imunocompatíveis. Assim, a comunidade científica realiza estudos com o intuito de encontrar dadores alternativos, nomeadamente, dadores não relacionados, dadores haploidênticos e utilização de sangue de cordão umbilical. (116–119)

Um dos métodos de obtenção de dador é através do diagnóstico genético pré-implantação (DGPI). Em 1999, verificou-se o primeiro caso de sucesso em DR. (120) O DGPI pode ser definido como um método muito precoce de diagnóstico pré-natal (DPN), tendo como intuito de transferência de embriões não afetados e conduzindo ao nascimento de uma criança saudável em casais com um elevado risco de transmissão de uma doença genética ou cromossómica. (121,122) Assim, o DGPI apresenta-se como uma alternativa ao DPN e à interrupção médica da gravidez. (123–125) Esta

técnica requer fertilização *in vitro*, seguida por remoção de uma ou mais células do blastômero. Nesta técnica realizam-se 2 passos fundamentais: (112)

- Determinação do estado da doença, usando reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de mutação(ões) e permitindo apenas a transferência de embriões saudáveis para ser implantado no útero.
- Tipagem HLA dos embriões, permitindo a seleção de doadores com HLA idêntico para um irmão doente.

Todavia este DGPI é restringido pelo elevado custo e por preocupações éticas associadas. (112)

Independentemente das toxicidades e da falta de doadores, o TCEH tem uma vantagem de custo-efetividade comparativamente com a terapêutica de suporte (por exemplo, HU, TDS, terapêutica da dor) ao longo da vida do doente. Nos EUA, calcula-se que 50.000 doentes necessitem de mais de 100.000 admissões hospitalares por ano com custos associados de cerca de 10.000 dólares/doente/ano. (126) Ao passo que os custos de TCEH, a partir de MSD, em crianças são apenas 1900 dólares por cada ano de vida esperado. (127)

4.3.5.8 Novas terapêuticas em estudo

4.3.5.8.1 Fármacos

O fármaco ideal para tratamento da DR deveria ter propriedades analgésicas, ser capaz de prevenir CVOs ou eliminar CVO com rápido início de ação, diminuir a severidade e frequência de CVOs, ter um perfil de efeitos secundários limitado, ser eficaz para todos os doentes e estar disponível globalmente. (88)

Atualmente na comunidade científica estão a ser estudadas novos fármacos direcionados contra os vários processos fisiopatológicos da DR, com o intuito de melhorar o prognóstico geral desta doença ou tratar das suas complicações cardinais, vaso-oclusão. (29) Os processos fisiopatológicos são a adesão celular, as vias de inflamação, a indução de HbF e agentes anti-falciformação, anticoagulantes e agentes antiplaquetários (Tabela 5).

Tabela 5 – Novos medicamentos em estudo para tratamento da drepanocitose. Tendo como alvo quatro processos da fisiopatologia da hemoglobinopatia. [Adaptado de informações e tabelas de (29)]

Processo fisiopatológico	Métodos para controlo do processo	Fármacos
Adesão celular	Inibidores de selectina	Rivipansel (antes GMI-1070)
		SelG1
		Sevuparina
	Bloqueadores β	Propanolol
	Outros inibidores	Poloxamer 188
Vias de inflamação	Adenosina e Células NK T invariantes	Regadenosona
		NKTT120
	Leucotrienos	Montelukaste
		Zileuton
	Adesão de neutrófilos e Reagentes anti-inflamatórios não específicos	Imunoglobulina γ intravenosa (IVIg)
		Sinvastatina
Indução de HbF e Agentes anti-falciformação	Indução de HbF	Decitabina
		Butirato de arginina
		Pomalidomida
	Modificadores de HbF e Agentes anti-falciformação	SCD-101
		<i>Sanguinate</i>
		Senicapoc (ICA-17043)
		Aes-103

Tabela 6 - Continuação da tabela 5

Processo fisiopatológico	Métodos para controlo do processo	Fármacos
Anticoagulantes e Agentes Antiplaquetários	Anticoagulantes	Antagonistas da vitamina K
		Heparinas
		Inibidores diretos de trombina e do factor X
	Agentes antiplaquetários	Eptifibatida
		Prasugrel
		Ticagrelor

Os fármacos contra a adesão celular atuam sobre as hemácias e/ou os leucócitos, pois o envolvimento de múltiplas interações de adesão tem sido demonstrado na vaso-oclusão, e estudos *ex* e *in vitro* sugerem a potencial eficácia desta abordagem. (29)

Um dos grupos farmacoterapêuticos é o dos inibidores de selectina, que inibem a adesão e/ou ativação de leucócitos, impedindo o seu recrutamento aos locais de inflamação. (29) Em estudos *in vitro* e em modelos de ratos, verificou-se que ao inibirem ambas as adesões mediadas por P-selectina e E-selectina levam a redução de vaso-oclusão. (128–133)

O rivipansel é um dos inibidores de selectina, atualmente em ensaios clínicos (EC) de fase 3, permite prevenir e reduzir a severidade de CVO. (130) Verificou-se, em EC de fase 1, que rivipansel reduz os biomarcadores de ativação endotelial, ativação de leucócitos e ativação de coagulação. (134) Em EC de fase 2, constatou-se que consegue reduzir a necessidade do uso de opióides em CVO, bem como diminuição da duração de CVO e do tempo de hospitalização. (135) Este fármaco é bem tolerado em CVO e, apesar de inibidores de selectina prevenirem a migração leucocitária aos locais de infecção, ainda não foi observado, até agora, infecções clínicas relacionadas com rivipansel. (29)

O SelG1 é um anticorpo monoclonal humanizado contra a P-selectina. Segundo EC de fase 1 em humanos adultos saudáveis, SelG1 demonstrou ser bem tolerado e efetivo no

bloqueio da função da P-selectina. Atualmente, está em curso um EC de fase 2, com o intuito de verificar se SelG1 poder ser usado profilaticamente para prevenção de eventos de CVO. (29,136)

As heparinas são conhecidas pela sua capacidade em inibir interações de adesão por via de P-selectina. (131,137) A sevuparina é um derivado de heparina de baixo peso molecular, que está a ser desenvolvido como um bloqueador de P-selectina. Sevuparina retém o domínio da heparina responsável pela ligação à P-selectina, todavia carece das propriedades anticoagulantes. É capaz de inibir a adesão de drepanócitos às células endoteliais (CEs) *in vitro* e de reduzir a vaso-oclusão induzida pelo fator de necrose tumoral *in vivo*. (138)

Sabe-se que a via de sinalização β_2 adrenérgica tem um papel na ativação dos recetores de adesão BCAM/Lu e ICAM-4 das hemácias, pelo que foi sugerido a possibilidade de que os bloqueadores β poderiam reduzir a adesão de hemácias. (29) Num EC de fase 1 em humanos, demonstrou-se que propranolol por via oral está associado à redução da habilidade de epinefrina estimular a adesão de drepanócitos *in vitro*. (139) Em fase 2, o propranolol diminuiu os níveis de todos os biomarcadores (E-selectina solúvel, P-selectina, ICAM-1, VCAM-1), todavia essa diminuição não era estatisticamente significativa. (140) Agora está em EC de fase 2 em crianças sem asma. Porém devido à alta prevalência de asma nos doentes com DR receia-se que o propranolol possa não ser bem tolerado por muitos doentes. (29)

O Polaxamer 188 é um surfactante que altera o modo de interação entre as células e a água. Por via IV o polaxamer 188 melhora o fluxo sanguíneo através de múltiplos mecanismos, nomeadamente inibição não específica de adesão celular, redução da viscosidade sanguínea e diminuição da fricção ao longo da parede vascular. (141) O polaxamer 188 já está em EC de fase 3, e descobriu-se que consegue reduzir moderadamente a duração de episódios de dor. (142,143)

A inflamação tem um papel fundamental na fisiopatologia da DR, havendo o envolvimento de leucócitos, plaquetas e múltiplas vias pro-inflamatórias. De notar que a vaso-oclusão não só prejudica diretamente por via hipoxemia local, como estimula uma resposta inflamatória típica de ferimentos de hipoxia/reperfusão, envolvendo tanto os leucócitos mononucleares como os polimorfonucleares (PMN), juntamente com uma vasta gama de citocinas pró-inflamatórias. (29,133,144)

As células T *Natural Killer* invariantes (iNKT) estão implicadas nas feridas de hipoxia/reperfusão. (145,146) A ativação celular de iNKT e a produção de citocinas por iNKT pode ser *downregulated* por ativação dos recetores de adenosina A2A (RA2A). (147–149) A expressão de RA2A em células iNKT pulmonares é significativamente aumentada em ratos com DR, e estudos recentes demonstram que o bloqueio da ativação dessas células no rato reduz a inflamação pulmonar e os ferimentos. (147) Todavia a adenosina também, normalmente, estimula a produção de 2,3-bifosfoglicerato via ativação de recetores A2B das hemácias, promovendo-se, assim a libertação de oxigénio. Esta libertação é preocupante pois promoverá a desoxigenação de HbS e, consequentemente, a polimerização da mesma. (150)

Um dos fármacos que atuam nos recetores adenosina é a regadenosona, mais especificamente atua como agonista parcialmente seletivo de recetor A2A. (29) Regadenosona existe na Europa sob a nome comercial de rapiscan 400 mg injetável, que apenas pode ser usado em diagnóstico e consiste num “vasodilatador coronário seletivo para utilização como agente farmacológico indutor de *stress* para cintigrafia de perfusão do miocárdio (CPM) em doentes adultos que não podem ser submetidos a uma prova de esforço adequada”. (151) Segundo EC de fase 1 (NCT01085201) em humanos com DR, regadenosona pode ser administrada com segurança em crianças e adultos em situação estável e em CVO, apesar de na literatura estarem demonstrados efeitos adversos a nível cardíaco e pulmonar em indivíduos sem DR. O fármaco ao ser administrado por perfusão durante 24 horas num caso de CVO, conseguiu diminuir significativamente a ativação de *phospho-nf.kB p65* em células iNKT e não foi associada a toxicidade. Atualmente, está em EC de fase 2 (NCT01788631), estudando-se em crianças e adultos sofrendo de CVO, com objetivo de determinar se infusão de regadenosona reduz ativação celular de iNKT em indivíduos com DR sofrendo de CVO ou STA, quando comparado com placebo. (29)

Outro fármaco direcionado contra células iNKT é o anticorpo monoclonal humanizado NKTT120, que é capaz de matar as células iNKT *in vivo* em animais, através do mecanismo *antibody dependent celular cytotoxicity*. (152–154) De momento, apenas terminou EC de fase 1 (NCT01783691) e não há registos de fase 2. Este fármaco foi concedido o estado *fast-track* pela FDA.

Devido ao facto da DR e a asma estarem associados e sabendo que a inflamação é importante para vaso-oclusão e danos teciduais, o outro método em estudo é a

downregulation de leucotrienos, um dos mediadores inflamatórios associado à asma. (155) Em estado estacionário da DR, verifica-se que cisteínil-leucotrienos (CysLT) e leucotrieno E4 (LTE4) estão elevados, e estes níveis estão correlacionados com a taxa de eventos de dor. (156) Montelukaste é permitido pelo INFARMED e pela FDA para tratamento de asma, trata-se dum inibidor de CysLT através da ligação a recetores CysLT. Encontra-se em EC de fase 2 (NCT01960413), em doentes controlados por doses estáveis de HU. Os cientistas estão a investigar se montelukate tem efeitos aditivos em doentes que já estão a tomar HU, comparativamente a doentes que apenas tomam HU. (29)

Uma abordagem distinta, consiste na inibição da enzima implicada na síntese de leucotrienos, isto é, a 5-lipoxigenase (5-LO). Zileuton não está aprovado pela EMA, mas sim pela FDA, para tratamento de asma como inibidor de 5-LO, interferindo assim a síntese de leucotrienos. Na DR, o fator de crescimento placentário está elevado devido a eritropoiese hiperplástica e isso leva à ativação, por indução de 5-LO de monócitos e CEs. (157) Essa indução de 5-LO conduzirá à produção de leucotrienos, incluindo LTB4 (um potente quimiotático e ativador de neutrófilos e de CEs) e LTE4 (associado à inflamação pulmonar). Na DR também se encontra elevada a interleucina-13 (IL-13) e esta estimula a expressão de VCAM-1 que, segundo a literatura, está associado à mortalidade. (158,159) Assim, no contexto da DR, zileuton vai reduzir a adesão de PMN e de drepanócitos na vasculatura pulmonar do rato (160) e reduzir a produção de IL-3 por linfócitos esplénicos de ratinhos. (161) Atualmente zileuton está em EC de fase 1 (NCT01136941) para estudar se inibe atividade de 5-LO em crianças e adultos com DR e se diminui significativamente os leucotrienos e biomarcadores de inflamação. É interessante de notar que zileuton tem sido associado ao aumento de HbF, pelo que este efeito também está a ser examinado. (29,162)

O último método para controlar a inflamação consiste na inibição de adesão de neutrófilos e reagentes anti-inflamatórios não específicos. A imunoglobulina γ intravenosa (IVIg) inibe a adesão de neutrófilos. Num ensaio em ratinhos com DR e com CVO, IVIg foi capaz de reduzir rapidamente a aderência de leucócitos, levando a uma diminuição significativa das interações hemácias-leucócitos e aumentado o fluxo de sangue na microvasculatura e a sobrevivência. (163,164)

As estatinas reduzem a inflamação endotelial em doenças cardiovasculares, por isso estão a ser estudados em DR. Sinvastatina, num estudo piloto em crianças, foi capaz de

aumentar, de modo dose dependente, os níveis de NOx e diminuir proteína C reativa e IL-6. E não teve nenhum efeito sobre a expressão do fator de crescimento endotelial, de VCAM-1 ou do fator tecidual. (165)

Continuam a estudar-se novas formas de induzir a síntese de HbF. A decitabina é um de fármaco em estudo nesta área, sendo capaz de desmetilar e reativar a expressão do gene metilado de globina γ . (29)

O butirato é o primeiro inibidor das histonas desacetilases a ser estudado na DR. Num estudo verificou-se que a infusão de butirato de sódio é eficaz (166), ao passo que, por via oral, geralmente produz resultados não impressionantes. (167–169)

A pomalidomida tem a capacidade de *upregulate* a produção de HbF *in vitro* e em rato com DR. (170,171) Segundo um EC em humanos (NCT01522547), a pomalidomida apenas consegue aumentar os níveis de HbF e Hb total se se administrar na dose máxima ou com uma exposição ao fármaco superior a seis meses. (29)

Em relação aos modificadores de HbF e agentes anti-falciformação o *sanguinate* é o mais interessante, pois foi o único a que a FDA atribuiu o estatuto de medicamento órfão. *Sanguinate* consiste numa Hb bovina peguilada, que reduz a falciformação por transferência de monóxido de carbono (potente agente anti-falciformação, pois ao ligar-se à HbS previne ou reverte a sua polimerização) e, posteriormente, transporte de oxigénio. (29) Num EC de fase 1, *sanguinate* foi administrado com segurança em indivíduos saudáveis e em doentes com DR. (172)

Dos EC realizados relativamente aos anticoagulantes, mais especificamente, os antagonistas de vitamina K e as heparinas (efeito sobre os marcadores de ativação de coagulação não significativos) não tiveram bons resultados. Por exemplo, os antagonistas de vitamina K estão associados a número significativo de episódios de sangramento (173) e a dalteparina (heparina de baixo peso molecular), em dose profilática, não tem efeito significativo sobre os marcadores de ativação de coagulação (174).

Em teoria, pensa-se que as plaquetas e a ativação plaquetária contribuem para a fisiopatologia da DR por vários mecanismos, incluindo a participação na formação de agregados de células sanguíneas (175,176), libertação de citocinas pro-inflamatórias (177) e ativação de vias de coagulação (29).

Um dos fármacos antiplaquetários é a eptifibatida, cujos EC terminaram e sem nenhuma progressão planeada, uma vez que falharam na redução do tempo de resolução de CVO. (178)

O prasugrel demonstra resultados promissores nos EC. (29) Em EC de fase 1, em rato com DR, o prasugrel atenuou parcialmente a ativação das plaquetas a nível basal e a nível de estimulação por agonistas. (179) Em EC de fase 2, o prasugrel diminuiu significativamente a ativação de plaquetas em adultos com DR, apesar de a diminuição da dor ser insignificante. (29)

E por último, o ticagrelor encontra-se de momento em EC de fase 2 (NCT02482298), com o intuito de determinar se será capaz de diminuir o número de dias em que há dor, a intensidade da dor e se é possível o seu uso como analgésico. (29)

4.3.5.8.2 Terapêutica genética

A falta de dadores para TCEH incentivou o avanço de estudos de terapia genética (TG). Através da TG é possível a realização de transplantação autóloga usando as células estaminais hematopoiéticas (CEH) do próprio doente, cujos genes são corrigidos *in vitro*, permitindo, assim, criar uma nova fonte de dador imunocompatível (Figura 7). No caso de o isolamento de CEH não ser possível, como alternativa podem-se isolar células somáticas (da pele ou do sangue periférico), mas que necessitam de uma reprogramação, originando as células estaminais pluripotentes induzidas (CEPI). Posteriormente, essas CEPI são geneticamente corrigidas e diferenciadas em CEH, que já poderão ser transplantadas no doente. (180)

A TG consiste na introdução de genes no interior das células e tecidos dum indivíduo, a fim de tratar uma doença. A maioria das condições patológicas tratadas com esta terapêutica são doenças genéticas resultantes de mutações que tornam os genes não funcionais. (181) Esta terapêutica adquiriu particular relevo no ano 2000, quando se demonstrou que vetores lentivírus, contendo genes de globina humanos normais e regiões regulatórias provenientes da região de controlo do locus da globina β , foram capazes de introduzir esses genes em CEH e esses mesmos genes foram expressos em eritrócitos. (182,183)

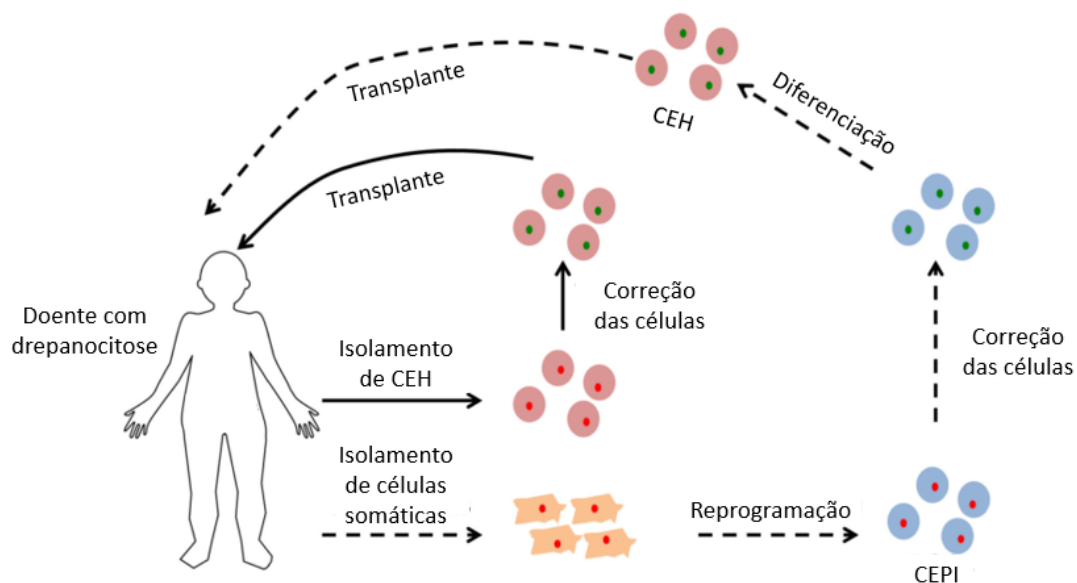


Figura 7 – Terapias genéticas potenciais para tratamento de drepanocitose. As setas a tracejado indicam o procedimento de células estaminais pluripotentes induzidas (CEPI). [Adaptado da Figura 1 de (180)]

A DR é uma boa candidata para TG, pois trata-se de uma patologia monogénica em que o fenótipo normal pode ser restaurado através da uma única cópia normal do gene mutante. (184)

Os vírus são os vetores mais usados nesta terapêutica para transferência do(s) gene(s) terapêutico(s). Alguns dos tipos de vírus usados são: retrovírus, adenovírus, parvovírus, vírus herpes simples, vírus da hepatite, e vírus vaccinia. (181) Estes vetores são preparados de modo a serem inofensivos, através da remoção do gene viral e substituição pelo gene terapêutico. Em teoria, a remoção do gene viral impede a replicação do vírus e o aparecimento de efeitos secundários. Todavia, não é totalmente seguro e os vírus podem ativar respostas imunitárias não desejadas, ou poderão levar a carcinogénese devido a inserção aleatória de mutações. (180,185)

Inicialmente, os principais objetivos da TG eram a adição génica (AG) de gene de globina γ ou de globina β de modo a produzir proteínas que inibem a polimerização da proteína HbS. (186–189) Todavia, a AG tinha a desvantagem da transferência pelo vírus ser aleatória. (190)

Um método inovador foi o *gene targeting* (GT) e pode ser definido como a introdução precisa de mudanças genéticas específicas através de sequências de vetor homólogas (Figura 8). (191) O vetor contém o ADN a adicionar no local específico do ADN genómico (ADNg), um marcador de seleção positivo e 2 *homology arms* (HAs). O

ADN vetor será inserido através dum processo recombinação homóloga (RH) (recorrendo a mecanismos naturais da célula) entre os HAs e as suas correspondentes sequências homólogas no ADNg. No fim, o marcador terá de ser removido por excisão, por métodos como sistema Cre-loxP ou *piggyBac-excision*. (180)

O GT tem a vantagem de requerer apenas a substituição do gene de globina mutante por um gene correto, preservando assim o ambiente natural do gene *HBB*. (180)

Todavia, ao usar o método tradicional de RH também tem desvantagens que impede o seu uso na prática clínica, uma vez que para inserir o ADN do vetor recorre-se a *DNA double strand breaks* (DSBs) espontâneas do genoma. As DSBs são quebras da dupla cadeia de ADN que ocorrem naturalmente no ADNg, devido a processos de replicação de ADN ou devido a exposição a agentes genotóxicos. Um dos mecanismos de reparação naturais do ADNg é por via de RH, que depende de fatores celulares que ocorrem especialmente nas fases celulares S e G2. (192) Ou seja:

- estas DSB espontâneas são raras na região do genoma que se quer tratar, requerendo ao uso de HAs extensas para capturar as DSBs (193)
- a frequência da ocorrência de DSB e HR no genoma é baixa (menor que 1 evento por cada 10^5 células) (194,195)



Figura 8 – Gene targeting através de recombinação homóloga. [Adaptado da Figura 2a de (180)]

Tendo em conta estas desvantagens veio outro método mais atrativo, que é capaz de induzir DSBs em locais específicos de qualquer região de interesse do genoma, é o uso de nucleases programáveis. Essa indução é realizada pela capacidade dessas ferramentas recrutarem uma endonuclease ao local especificado. Depois de induzida a DSB, o gene desejado será introduzido no genoma na altura em que a DSB é sujeita aos

mecanismos celulares de reparação de ADN. E um dos mecanismos de reparação é a RH. (180)

Das nucleases programáveis, as três mais estudadas são as seguintes: *zinc finger nucleases* (ZFNs), *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) e *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)-associated protein 9 (CRISPR/Cas9). (180)

ZFNs são proteínas artificiais compostas por 2 domínios funcionais fundidos entre si (Figura 9):

- *DNA binding domain* (DBD) – baseada em fatores eucarióticos de *zinc finger transcription*. Consiste em repetições em tandem de 3 a 6 proteínas *zinc finger*, em cada repetição reconhece 3 pares de bases (pb). As proteínas *zinc finger* foram criadas de modo a reconhecerem a maioria das combinações de 3 pb. Assim, cada monómero de ZFNs reconhece uma sequência de ADN de 9 a 18 pares de bases. (196)
- *FokI endonuclease domain* – responsável pela clivagem do ADN, criando a DSB. Este domínio apenas funciona se ZFN estiver dimerizado. (196,197)

O dímero de ZFNs reconhece no total sequências de 18 a 36 pb e liga-se ao ADN numa orientação *tail-to-tail* com um *spacer* entre os locais de ligação de cada monómero, permitindo assim a dimerização de *FokI*. A DSB é criada na região entre os 2 locais de ligação de ZFN. (180,196,198,199)

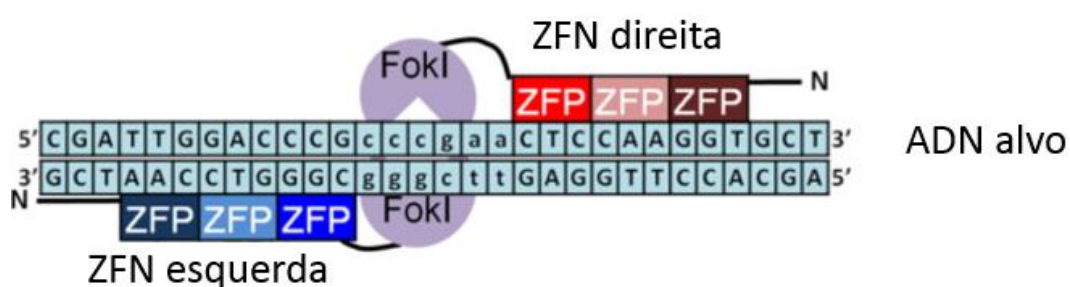


Figura 9 – Representação esquemática da ZFN. [Adaptado da Figura 3a de (180)]

As TALENs, à semelhança dos ZFNs, ligam-se a sequências específicas de ADN e também funcionam em heterodímeros para induzir DSB (Figura 10). (200) As TALENs também são compostas por 2 domínios funcionais fundidos entre si: (201,202)

- DBD – derivado de *transcription activator-like effector* (TALEs) da bactéria patogénica duma planta - *Xanthomonas* -, que injeta TALEs para o interior das células da planta e que atuam como ativadores de transcrição no núcleo. (203) DBD consiste em repetições em tandem de 33 a 35 aminoácidos. (204,205)____
- Domínio de nuclease *FokI* – necessita, tal como nos ZFNs, de 2 pares de TALEN para clivar o DNA e criar o DSB. (180)

As TALENs são criadas para terem 14 a 31 repetições, que se diferem apenas no 12º e no 13º resíduos de aminoácido, por isso são conhecidas como *repeats variable diresidue* (RVD). (204,205)____ O código de reconhecimento tipicamente usado é: NI reconhece adenina, NG reconhece timina, HD reconhece citosina, NH reconhece guanina e NN reconhece guanina e adenina. (180)

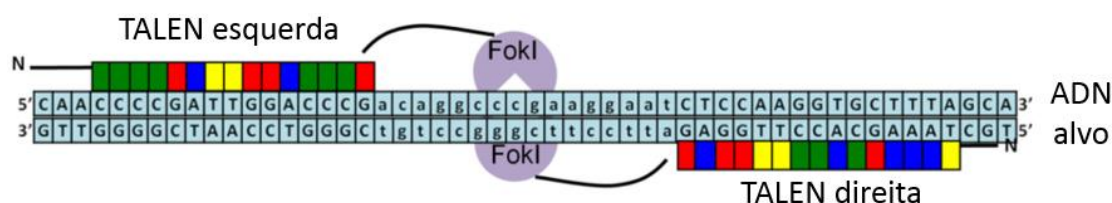


Figura 10 – Representação esquemática das TALENs. [Adaptado da Figura 3b de (180)]

A CRISPR/Cas9 é a ferramenta mais nova e mais popular, devido à sua facilidade de utilização e por ser custo-efetivo (Figura 11). Ao contrário das ZFNs e das TALENs, o reconhecimento de DNA é baseado em interação ARN-ADN, em vez de interação proteína-ADN. O único requisito de CRISPR/Cas9 é que a sequência de ADN tem que estar imediatamente a montante de um *protospacer adjacent motif* (PAM). Esta tecnologia é composta por 2 principais constituintes: (180,206)

- *Guide RNA* (gRNA) – contém uma sequência de reconhecimento de 20 nucleótidos, estabelecidos pelo utilizador, e é capaz de recrutar a Cas9 para qualquer sequência de ADN.

- Endonuclease Cas9 – associada ao *scaffold* do gRNA. A proteína Cas9 mais usada provém da bactéria *Streptococcus pyogenes*, e requer uma sequência de PAM de 5'-NGG-3'. Após ligação de gRNA ao local de interesse, a Cas9 induz uma DSB de cerca de 3 nucleótidos a montante do PAM.

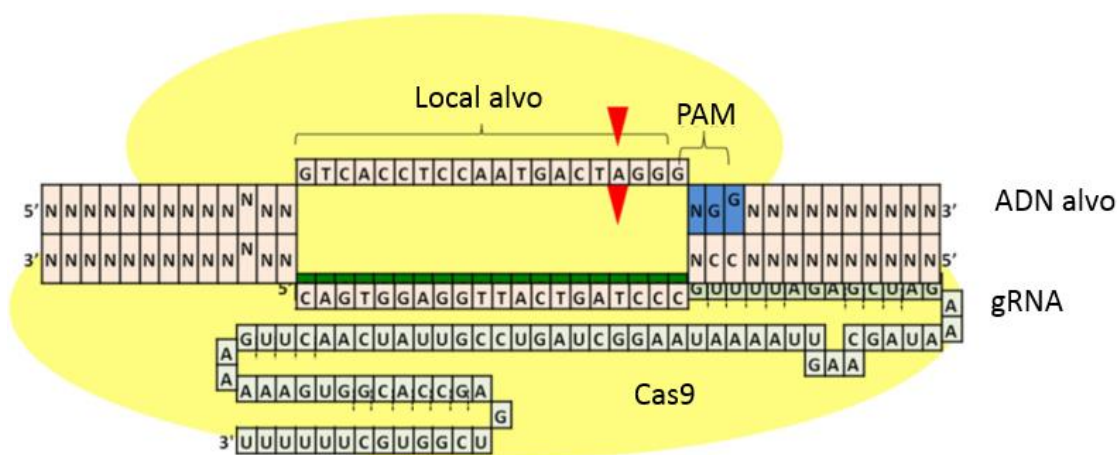


Figura 11 – Representação esquemática da CRISPR/Cas9. [Adaptado da Figura 3c de (180)]

Nestes últimos anos, as tecnologias de engenharia genética evoluíram rapidamente, contudo vários parâmetros ainda não foram totalmente estudados. Por exemplo, a modificação de CEH tem sido muito ineficiente, sendo que o único caso de sucesso, em termos de níveis clínicos, foi o estudo de DeWitt et al. (207) Por outro lado, apesar destas tecnologias serem amplamente usadas, os mecanismos de ação ainda não estão completamente elucidados. Os métodos de TG mencionados não têm uma especificidade de reconhecimento de 100%, pelo que podem inserir o ADN terapêutico noutra local do genoma e levar a efeitos indesejáveis (criação de novas mutações). Ainda é necessário descobrir outros métodos de transferência de ADN terapêutico mais seguros, de modo a reduzir toxicidades e efeitos secundários. Outro grande problema é a natureza do próprio ADN, uma vez que esta pode induzir à integração aleatória do ADN terapêutico, e o próprio ADN terapêutico nem sempre mantém a sua expressão a longo prazo nas células modificadas. Por outro lado, os efeitos a longo prazo das nucleases programáveis ainda não foram estudados. Em suma, a TG ainda não está disponível para ser usada na prática clínica. (180)

5 Conclusões e perspectivas futuras

Nestes últimos 40 anos, houve uma grande evolução científica nas áreas multidisciplinares da DR, passando de uma doença fatal da idade pediátrica para uma doença crónica da idade adulta. No entanto esta evolução científica não é ainda suficiente, pois sendo atualmente uma doença crónica, está associada a uma grande diminuição da qualidade de vida nestes doentes, que têm uma esperança média de vida de 50 anos. De referir que esta doença pesa, igualmente, nas despesas do Sistema Nacional de Saúde, dado que os tratamentos, ao longo da vida dos doentes, são dispendiosos.

Prevê-se que o próximo passo seja o desenvolvimento de terapia genética, de modo a curar esta(s) mutação(ões). Já existem vários estudos (NCT021866418, NCT02247843) nesta área, nomeadamente um estudo para β -talassemia (NCT01639690), que se encontra em fase de desenvolvimento.

Durante este período de ausência de cura, seria benéfica a entrada no mercado dos novos medicamentos referidos ao longo desta monografia, pois estes irão complementar ou substituir a hidroxiureia e/ou a transfusão sanguínea crónica em doentes que não têm protocolos de manutenção ou que não sejam controlados com estas duas formas terapêuticas. Tendo em conta a complexa fisiopatologia da DR, a terapêutica ideal apenas poderá ser atingida com a junção de vários métodos, tendo como alvo os diferentes mecanismos fisiopatológicos, em simultâneo.

No que se refere aos países em desenvolvimento, onde as vítimas de mortalidade infantil e o sofrimento das complicações na idade adulta ainda são uma realidade atual, a implementação de estudos de protocolos terapêuticos nestas populações, bem como a ajuda financeira, são fundamentais para melhorar a qualidade de vida dos doentes.

Referências Bibliográficas

1. Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *Yale J Biol Med* [Internet]. 2001;74(3):179–84. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2588723/>
2. Yawn B, Buchanan G, Afenyi-Annan A, Ballas S, Hassell K, James A, et al. Management of sickle cell disease: Summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. *JAMA* [Internet]. 2014;312(10):1033–48. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2014.10517>
3. Azar S, Wong TE. Sickle Cell Disease: A Brief Update. *Med Clin North Am* [Internet]. 2017;101(2):375–93. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025712516373606>
4. Yawn BP, Buchanan GR, Afenyi-Annan AN, Ballas SK, Hassell KL, James AH, et al. Evidence-based management of Sickle Cell Disease - Expert Panel Report, 2014. *J Am Med Assoc* [Internet]. 2014; Disponível em: [https://www.nhlbi.nih.gov/sites/www.nhlbi.nih.gov/files/sickle-cell-disease-report 020816.pdf](https://www.nhlbi.nih.gov/sites/www.nhlbi.nih.gov/files/sickle-cell-disease-report%200816.pdf)
5. Piel FB, Hay SI, Gupta S, Weatherall DJ, Williams TN. Global Burden of Sickle Cell Anaemia in Children under Five, 2010–2050: Modelling Based on Demographics, Excess Mortality, and Interventions. *PLOS Med* [Internet]. 2013;10(7):e1001484. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001484>
6. Bender M, Seibel G. Sickle Cell Disease. Em: Pagon R, Adam M, Ardinger H, Al. E, editores. *GeneReviews* [Internet]. Seattle University of Washington; 2017. p. 1–43. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1377/>
7. Silva IV, Reis AF, Palaré MJ, Ferrão A, Rodrigues T, Morais A. Sickle cell disease in children: chronic complications and search of predictive factors for adverse outcomes. *Eur J Haematol* [Internet]. 2015 [citado 18 de Julho de 2017];94(2):157–61. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/ejh.12411>
8. Costa SN, Madeira S, Sobral MA, Delgadinho G. Hemoglobinopatias em Portugal e a intervenção do médico de família. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar* [Internet]. 2016 [citado 10 de Julho de 2017];32(6):416–24. Disponível em: http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2182-51732016000600009
9. Manca L, Masala B. Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin. *IUBMB Life* [Internet]. 2008 [citado 25 de Maio de 2017];60(2):94–111. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/iub.4>
10. Bauer DE, Orkin SH. Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies. *Curr Opin Pediatr* [Internet]. 2011;23(1):1–8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3092400/>
11. Bauer DE, Orkin SH. Hemoglobin switching’s surprise: the versatile transcription factor BCL11A is a master repressor of fetal hemoglobin. *Curr Opin Genet Dev* [Internet]. 2015;33:62–70. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4705561/>

12. Ngo DA, Steinberg MH. Genomic approaches to identifying targets for treating β hemoglobinopathies. BMC Med Genomics [Internet]. 2015;8:44. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4517356/>
13. Sankaran VG, Orkin SH. The switch from fetal to adult hemoglobin. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2013 [citado 12 de Agosto de 2017];3(1):a011643. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23209159>
14. Sankaran VG, Xu J, Orkin SH. Advances in the understanding of haemoglobin switching. Br J Haematol [Internet]. 2010 [citado 13 de Agosto de 2017];149(2):181–94. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4153468/>
15. Katsumura KR, DeVilbiss AW, Pope NJ, Johnson KD, Bresnick EH. Transcriptional Mechanisms Underlying Hemoglobin Synthesis [Internet]. Vol. 3, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2013. p. a015412. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3753722/>
16. Masuda T, Wang X, Maeda M, Canver MC, Sher F, Funnell APW, et al. Transcription factors LRF and BCL11A independently repress expression of fetal hemoglobin [Internet]. Vol. 351, Science (New York, N.Y.). 2016. p. 285–9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4778394/>
17. Forget BG, Bunn HF. Classification of the Disorders of Hemoglobin. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2013;3(2):a011684. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3552344/>
18. Miranda A. Hemoglobinopatias em Portugal e estratégias de Prevenção: Contributo do Laboratório de Hematologia e Bioquímica [Internet]. 2014. p. 26. Disponível em: [http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/2468/1/Hemoglobinopatias em Portugal e estratégias de Prevenção.pdf](http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/2468/1/Hemoglobinopatias%20em%20Portugal%20e%20estrat%C3%A9gias%20de%20Preven%C3%A7%C3%A3o.pdf)
19. Ribeiro IS. Drepanocitose. Em: Lidel, editor. Hematologia da Prática Clínica à Teoria. Lisboa: Lidel; 2015. p. 16-19-185.
20. Chaturvedi S, DeBaun MR. Evolution of sickle cell disease from a life-threatening disease of children to a chronic disease of adults: The last 40 years. Am J Hematol [Internet]. 2016 [citado 9 de Julho de 2017];91(1):5–14. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.24235/abstract>
21. Martins MC, Olim G, Melo J, Magalhães HA, Rodrigues MO. Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. J Med Genet [Internet]. 1993;30(3):235–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1016307/>
22. Monteiro C, Rueff J, Falcao AB, Portugal S, Weatherall DJ, Kulozik AE. The frequency and origin of the sickle cell mutation in the district of Coruche/Portugal. Hum Genet [Internet]. 1989;82(3):255–8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00291165>
23. Lavinha J, Gonçalves J, Faustino P, Romão L, Osório-Almeida L, Peres MJ, et al. Importation Route of the Sickle Cell Trait into Portugal: Contribution of Molecular Epidemiology. Hum Biol [Internet]. 1992;64(6):891–901.

Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/41464346>

24. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* [Internet]. 2007;21(1):37–47. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048670/>
25. Farrell K, Dent L, Nguyen ML, Buchowski M, Bhatt A, Aguinaga M del P. The Relationship of Oxygen Transport and Cardiac Index for the Prevention of Sickle Cell Crises. *J Natl Med Assoc* [Internet]. 2010;102(11):1000–7. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3072584/>
26. Telen MJ. It really IS the red cell. *Blood* [Internet]. 2008;112(3):459 LP-460. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/112/3/459.abstract>
27. Dong C, Chadwick RS, Schechter AN. Influence of sickle hemoglobin polymerization and membrane properties on deformability of sickle erythrocytes in the microcirculation. *Biophys J* [Internet]. 1992;63(3):774–83. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1262210/>
28. MAGDOFF-FAIRCHILD B, SWERDLOW PH, BERTLES JF. Intermolecular Organization of Deoxygenated Sickle Haemoglobin determined by X-ray Diffraction. *Nature* [Internet]. 1972;239(5369):217–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/239217a0>
29. Telen MJ. Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. *Blood* [Internet]. 2016;127(7):810–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4760087/>
30. Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sickle cell disease. *Lancet* [Internet]. 2017;390(10091):311–23. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30193-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30193-9)
31. Silva DGH, Junior EB, Almeida EA, Bonini-Domingos CR. Oxidative stress in sickle cell disease: An overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2013 [citado 10 de Julho de 2017];65:1101–9. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584913005844>
32. Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology [Internet]. Vol. 127, *Blood*. Washington, DC; 2016. p. 801–9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4760086/>
33. Setty BNY, Kulkarni S, Rao AK, Stuart MJ. Fetal hemoglobin in sickle cell disease: relationship to erythrocyte phosphatidylserine exposure and coagulation activation. *Blood* [Internet]. 2000;96(3):1119 LP-1124. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/96/3/1119.abstract>
34. Hebbel RP, Yamada O, Moldow CF, Jacob HS, White JG, Eaton JW. Abnormal Adherence of Sickle Erythrocytes to Cultured Vascular Endothelium: Possible Mechanism for Microvascular Occlusion in Sickle Cell Disease. *J Clin Invest* [Internet]. 1980;65(1):154–60. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI109646>
35. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The Endothelial Biology of Sickle Cell Disease: Inflammation and a Chronic Vasculopathy. *Microcirculation*

- [Internet]. 2004 [citado 10 de Julho de 2017];11(2):129–51. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1080/10739680490278402/abstract>
36. Eaton WA, Bunn HF. Treating sickle cell disease by targeting HbS polymerization. *Blood* [Internet]. 2017;129(20):2719–26. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5437829/>
 37. Meier ER, Fasano RM, Levett PR. A systematic review of the literature for severity predictors in children with sickle cell anemia. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. 2017 [citado 22 de Julho de 2017];65:86–94. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079979616301383?via%3Dihub>
 38. Zarkowsky H, Gallagher D, Gill F, Wang W, Falletta J, Lande W, et al. Bacteremia in sickle hemoglobinopathies. *J Pediatr* [Internet]. 1986 [citado 18 de Julho de 2017];109(4):579–85. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347686802165>
 39. H. GM, I. VJ, Gerald W, Charles P, John K, Gerald P, et al. Prophylaxis with Oral Penicillin in Children with Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* [Internet]. 1986;314(25):1593–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198606193142501>
 40. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, et al. Pain in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 1991;325(1):11–6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199107043250103>
 41. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease [see comments]. *Blood* [Internet]. 1995;86(2):776 LP-783. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/86/2/776.abstract>
 42. Ballas SK, Lusardi M. Hospital readmission for adult acute sickle cell painful episodes: frequency, etiology, and prognostic significance. *Am J Hematol* [Internet]. 2005 [citado 19 de Julho de 2017];79(1):17–25. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.20336/abstract>
 43. Jacob E, Beyer JE, Miaskowski C, Savedra M, Treadwell M, Styles L. Are There Phases to the Vaso-Occlusive Painful Episode in Sickle Cell Disease? *J Pain Symptom Manage* [Internet]. 2005;29(4):392–400. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2004.07.006>
 44. Smith W, Penberthy L, Bovbjerg V, McClish D, Roberts J, Dahman B, et al. Daily assessment of pain in adults with sickle cell disease. *Ann Intern Med* [Internet]. 2008;148(2):94–101. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-148-2-200801150-00004>
 45. Houston-Yu P, Rana SR, Beyer B, Castro O. Frequent and prolonged hospitalizations: A risk factor for early mortality in sickle cell disease patients. *Am J Hematol* [Internet]. 2003 [citado 19 de Julho de 2017];72(3):201–3. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.10305/abstract>
 46. Mulder N, Nembaware V, Adekile A, Anie KA, Inusa B, Brown B, et al. Proceedings of a Sickle Cell Disease Ontology workshop — Towards the first comprehensive ontology for Sickle Cell Disease. *Appl Transl Genomics*

- [Internet]. 2016 [citado 9 de Julho de 2017];9:23–9. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212066116300187>
47. Ballas SK. Pain Management of Sick Cell Disease. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2005 [citado 19 de Julho de 2017];19(5):785–802. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889858805000894>
 48. Ballas SK. The Sick Cell Painful Crisis in Adults: Phs and Objective Signs. *Hemoglobin* [Internet]. 1995 [citado 19 de Julho de 2017];19(6):323–33. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03630269509005824>
 49. Adeyoju AB, Olujuhunge ABK, Morris J, Yardumian A, Bareford D, Akenova A, et al. Priapism in sickle-cell disease; incidence, risk factors and complications - an international multicentre study. *BJU Int* [Internet]. 2002 [citado 19 de Julho de 2017];90(9):898–902. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1464-410X.2002.03022.x/full>
 50. Olujuhunge AB, Adeyoju A, Yardumian A, Akinyanju O, Morris J, Westerdale N, et al. A Prospective Diary Study of Stuttering Priapism in Adolescents and Young Men With Sickle Cell Anemia: Report of an International Randomized Control Trial--The Priapism in Sickle Cell Study. *J Androl* [Internet]. 2010 [citado 19 de Julho de 2017];32(4):375–82. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/49654221_A_Prospective_Diary_Study_of_Stuttering_Priapism_in_Adolescents_and_Young_Men_With_Sickle_Cell_Anemia_Report_of_an_International_Randomized_Control_Trial--The_Priapism_in_Sickle_Cell_Study
 51. Bakanay SM, Dainer E, Clair B, Adekile A, Daitch L, Wells L, et al. Mortality in sickle cell patients on hydroxyurea therapy. *Blood* [Internet]. 2005;105(2):545–7. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/105/2/545.abstract>
 52. Charache S, Scott JC, Charache P. «Acute chest syndrome» in adults with sickle cell anemia: Microbiology, treatment, and prevention. *Arch Intern Med* [Internet]. 1979;139(1):67–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.1979.03630380047016>
 53. Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B, et al. Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease: Clinical Presentation and Course. *Blood* [Internet]. 1997;89(5):1787–92. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/89/5/1787.abstract>
 54. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, et al. Causes and Outcomes of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2000;342(25):1855–65. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200006223422502>
 55. Heeney M, Mahoney DH. The acute chest syndrome in children and adolescents with sickle cell disease [Internet]. UpToDate. 2011 [citado 30 de Julho de 2017]. Disponível em: <http://cursoenarm.net/UPTODATE/contents/mobipreview.htm?25/54/26465?view=print>
 56. Dessap AM, Deux J-F, Abidi N, Lavenu-Bombléd C, Melica G, Renaud B, et

- al. Pulmonary Artery Thrombosis during Acute Chest Syndrome in Sick Cell Disease. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2011;184(9):1022–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1164/rccm.201105-0783OC>
57. Hassell KL, Eckman JR, Lane PA. Acute multiorgan failure syndrome: A potentially catastrophic complication of severe sickle cell pain episodes. *Am J Med* [Internet]. 1994;96(2):155–62. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(94\)90136-8](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(94)90136-8)
 58. Badesch DB, Champion HC, Gomez Sanchez MA, Hoeper MM, Loyd JE, Manes A, et al. Diagnosis and Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2009 [citado 3 de Setembro de 2017];54(1):S55–66. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109709012145>
 59. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, et al. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2009 [citado 3 de Setembro de 2017];54(1):S43–54. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109709012169>
 60. NIH. What Is Pulmonary Hypertension? [Internet]. 2011 [citado 3 de Setembro de 2017]. Disponível em: <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/pah>
 61. Dampier C, Ely B, Brodecki D, O’Neal P. Characteristics of pain managed at home in children and adolescents with sickle cell disease by using diary self-reports. *J Pain* [Internet]. 2002;3(6):461–70. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1054/jpai.2002.128064>
 62. Ballas SK, Gupta K, Adams-Graves P. Sickle cell pain: a critical reappraisal. *Blood* [Internet]. 2012 [citado 30 de Julho de 2017];120(18):3647–56. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-383430>
 63. Ballas SK, Lieff S, Benjamin LJ, Dampier CD, Heeney MM, Hoppe C, et al. Definitions of the Phenotypic Manifestations of Sickle Cell Disease. *Am J Hematol* [Internet]. 2010;85(1):6–13. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5046828/>
 64. Koshy M, Entsuah R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, et al. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Blood* [Internet]. 1989;74(4):1403–8. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/74/4/1403.abstract>
 65. Direcção-Geral da Saúde. Circular Normativa 18/DSMIA/2004 - Prevenção das formas graves de Hemoglobinopatia [Internet]. Direcção-Geral da Saúde; 2004. p. 1–4. Disponível em: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/circular-normativa-n-18dsmia-de-07092004.aspx>
 66. Peres M, Carreiro M, Machado M, Seixas T, Picanço I, Batalha L, et al. Rastreio neonatal de hemoglobinopatias numa população residente em Portugal. *Acta Med Port* [Internet]. 1996;9:135–9. Disponível em: <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/download/2569/1982>
 67. Vilarinho L, Diogo L, Pinho e Costa P. Programa Nacional de Diagnóstico Precoce - Relatório 2015 [Internet]. INSA, IP; 2016. p. 1–74. Disponível em: <http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ComInf/Noticias/Paginas/PNDP->

68. Instituto Nacional de Saude Doutor Ricardo Jorge - IP. Plano Estratégico 2017-2019 [Internet]. 2017. p. 1–134. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.18/4788>
69. McGann PT, Ware RE. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. *Expert Opin Drug Saf* [Internet]. 2015;14(11):1749–58. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1517/14740338.2015.1088827>
70. Segal JB, Strouse JJ, Beach MC, Haywood C, Witkop C, Park H, et al. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell disease. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* [Internet]. 2008 [citado 31 de Julho de 2017];(165):1–95. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18457478>
71. EMA - Committee for Orphan Medicinal Products. Public Summary of Positive Opinion for Orphan Designation of Hydroxyurea for the treatment of sickle cell syndrome [Internet]. EMA; 2008 [citado 31 de Julho de 2017]. p. 1–4. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2009/10/WC500006488.pdf
72. EMA. EPAR Siklos [Internet]. EMA; 2017 [citado 31 de Julho de 2017]. p. 1–32. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000689/WC500050503.pdf
73. Elford HL. Effect of hydroxyurea on ribonucleotide reductase. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1968 [citado 1 de Agosto de 2017];33(1):129–35. Disponível em: <https://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/33096/0000482.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
74. Alvino GM, Collingwood D, Murphy JM, Delrow J, Brewer BJ, Raghuraman MK. Replication in Hydroxyurea: It's a Matter of Time. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2007;27(18):6396–406. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2099622/>
75. Koç A, Wheeler LJ, Mathews CK, Merrill GF. Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 [citado 1 de Agosto de 2017];279(1):223–30. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/279/1/223.long>
76. FDA. Hydrea (hydroxyurea capsules, USP) [Internet]. FDA; 2010 [citado 1 de Agosto de 2017]. p. 1–33. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/016295s040lbl.pdf
77. Baliga BS, Pace BS, Chen H-H, Shah AK, Yang Y-M. Mechanism for fetal hemoglobin induction by hydroxyurea in sickle cell erythroid progenitors. *Am J Hematol* [Internet]. 2000 [citado 1 de Agosto de 2017];65(3):227–33. Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1096-8652\(200011\)65:3<227::AID-AJH9%3E3.0.CO;2-V/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1096-8652(200011)65:3<227::AID-AJH9%3E3.0.CO;2-V/full)
78. Stamatoyannopoulos G, Veith R, Galanello R, Papayannopoulou T. Hb F Production in Stressed Erythropoiesis: Observations and Kinetic Models. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1985 [citado 1 de Agosto de 2017];445(1):188–97.

Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1985.tb17188.x/full>

79. Claster S, Vichinsky EP. Managing sickle cell disease. *BMJ Br Med J* [Internet]. 2003;327(7424):1151–5. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC261819/>
80. Chagas Costa F, Ferreira da Cunha A, Fattori A, de Sousa Peres T, Gilson Lacerda Costa G, Ferraz Machado T, et al. Gene expression profiles of erythroid precursors characterise several mechanisms of the action of hydroxycarbamide in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2007 [citado 2 de Agosto de 2017];136(2):333–42. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2006.06424.x/abstract>
81. Flanagan JM, Steward S, Howard TA, Mortier NA, Kimble AC, Aygun B, et al. Hydroxycarbamide alters erythroid gene expression in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2012 [citado 2 de Agosto de 2017];157(2):240–8. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2012.09061.x/abstract>
82. Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT, et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide–dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest* [Internet]. 2003;111(2):231–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI16672>
83. Gladwin MT, Shelhamer JH, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Nichols JS, Link B, et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol* [Internet]. 2002 [citado 2 de Agosto de 2017];116(2):436–44. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2141.2002.03274.x/abstract>
84. Nahavandi M, Tavakkoli F, Wyche MQ, Perlin E, Winter WP, Castro O. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. *Br J Haematol* [Internet]. 2002 [citado 2 de Agosto de 2017];119(3):855–7. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2141.2002.03919.x/abstract>
85. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert S V, et al. Effect of Hydroxyurea on the Frequency of Painful Crises in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* [Internet]. 1995;332(20):1317–22. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199505183322001>
86. Styles LA, Lubin B, Vichinsky E, Lawrence S, Hua M, Test S, et al. Decrease of Very Late Activation Antigen-4 and CD36 on Reticulocytes in Sickle Cell Patients Treated With Hydroxyurea. *Blood* [Internet]. 1997;89(7):2554–9. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/89/7/2554.abstract>
87. Kinney TR, Helms RW, O’Branski EE, Ohene-Frempong K, Wang W, Daeschner C, et al. Safety of Hydroxyurea in Children With Sickle Cell Anemia: Results of the HUG-KIDS Study, a Phase I/II Trial. *Blood* [Internet]. 1999;94(5):1550–4. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/94/5/1550.abstract>
88. Singh PC, Ballas SK. Emerging drugs for sickle cell anemia. *Expert Opin Emerg Drugs* [Internet]. 2015;20(1):47–61. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1517/14728214.2015.985587>

89. Meier ER, Rampersad A. Pediatric sickle cell disease: past successes and future challenges [Internet]. Vol. 81, *Pediatr Res. International Pediatric Research Foundation, Inc.*; 2017. p. 249–58. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2016.204>
90. Escobar C, Moniz M, Mascarenhas I, Silvestre C, Nunes P, Abadesso C, et al. Transfusão Permuta Parcial no Tratamento de Complicações Agudas na Drepanocitose Partial Exchange Transfusion in Treatment of Acute Complications of Sickle-Cell Disease. *Acta Pediátrica Port* [Internet]. 2015 [citado 10 de Agosto de 2017];46(3):205–10. Disponível em: [http://repositorio.hff.min-saude.pt/bitstream/10400.10/1577/1/Acta Pediatr Port 2015%2C 46%2C p 205-10.pdf](http://repositorio.hff.min-saude.pt/bitstream/10400.10/1577/1/Acta%20Pediatr%20Port%202015%2C%2046%2C%20p%20205-210.pdf)
91. Russell MO, Goldberg HI, Reis L, Friedman S, Slater R, Reivich M, et al. Transfusion therapy for cerebrovascular abnormalities in sickle cell disease. *J Pediatr* [Internet]. 1976 [citado 11 de Setembro de 2017];88(3):382–7. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002234767680251X>
92. Russell MO, Goldberg HI, Hodson A, Kim HC, Halus J, Reivich M, et al. Effect of transfusion therapy on arteriographic abnormalities and on recurrence of stroke in sickle cell disease. *Blood* [Internet]. 1984;63(1):162–9. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/63/1/162.abstract>
93. Estcourt LJ, Fortin PM, Hopewell S, Trivella M, Wang WC. Blood transfusion for preventing primary and secondary stroke in people with sickle cell disease [Internet]. Estcourt LJ, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2017 [citado 10 de Abril de 2017]. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD003146.pub3/abstract>
94. Amid A, Odame I. Improving Outcomes in Children with Sickle Cell Disease: Treatment Considerations and Strategies. *Pediatr Drugs* [Internet]. 2014;16(4):255–66. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40272-014-0074-4>
95. Ballas SK, Kesen MR, Goldberg MF, Luty GA, Dampier C, Osunkwo I, et al. Beyond the Definitions of the Phenotypic Complications of Sickle Cell Disease: An Update on Management. *Sci World J* [Internet]. 2012;2012:949535. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415156/>
96. Poggiali E, Cassinerio E, Zanaboni L, Cappellini MD. An update on iron chelation therapy [Internet]. Vol. 10, *Blood Transfusion*. 2012. p. 411–22. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3496216/>
97. EMA. Ferriprox: EPAR - Product Information [Internet]. 2017. p. 1–51. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000236/human_med_000789.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
98. EMA. Exjade: EPAR - Product Information [Internet]. 2017. p. 1–104. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000670/human_med_000780.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
99. Wong W-Y, D. Overturf G, R. Powars D. Infection Caused by *Streptococcus*

- pneumoniae in Children with Sick Cell Disease: Epidemiology, Immunologic Mechanisms, Prophylaxis, and Vaccination. Clin Infect Dis [Internet]. 1992;14(5):1124–36. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/14/5/1124/345511/Infection-Caused-by-Streptococcus-pneumoniae-in?redirectedFrom=fulltext>
100. Vernacchio L, Neufeld E, MacDonald K, Kurth S, Murakami S, Hohne C, et al. Combined schedule of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine followed by 23-valent pneumococcal vaccine in children and young adults with sickle cell disease [Internet]. Vol. 133, The Journal of Pediatrics. 1998. p. 275–8. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/13575035_Combined_schedule_of_7-valent_pneumococcal_conjugate_vaccine_followed_by_23-valent_pneumococcal_vaccine_in_children_and_young_adults_with_sickle_cell_disease?ev=auth_pub
 101. Marcinak JF, Frank AL, Labotka RL, Rao S, Drawhorn L, Dampier C, et al. Immunogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine in 3- to 17-month-old infants with sickle cell diseases. J Pediatr [Internet]. 1991 [citado 8 de Maio de 2017];118(1):69–71. Disponível em: <https://www.scholars.northwestern.edu/en/publications/immunogenicity-of-haemophilus-influenzae-type-b-polysaccharide-di>
 102. Quinn CT, Rogers ZR, McCavit TL, Buchanan GR. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease [Internet]. Vol. 115, Blood. Washington, DC; 2010. p. 3447–52. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2867259/>
 103. Alexander N, Higgs D, Dover G, Serjeant GR. Are there clinical phenotypes of homozygous sickle cell disease? Br J Haematol [Internet]. 2004 [citado 21 de Agosto de 2017];126(4):606–11. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2004.05025.x/abstract>
 104. FDA. FDA approved L-glutamine powder for the treatment of sickle cell disease [Internet]. Center for Drug Evaluation and Research; 2017 [citado 12 de Outubro de 2017]. Disponível em: <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm566097.htm>
 105. FDA. Endari (L-glutamine oral powder) - full prescribing information [Internet]. 2017 [citado 15 de Outubro de 2017]. p. 1–8. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/208587s000lbl.pdf
 106. Angelucci E, Matthes-Martin S, Baronciani D, Bernaudin F, Bonanomi S, Cappellini MD, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major and sickle cell disease: indications and management recommendations from an international expert panel. Haematologica [Internet]. 2014;99(5):811–20. Disponível em: <http://www.haematologica.org/content/99/5/811.abstract>
 107. Tafulo SCR. Transplantação de progenitores hematopoiéticos [Internet]. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2012. Disponível em: https://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi06fap65rWAhVB1RoKHZ-fCFwQFggI0MAA&url=https%3A%2F%2Fsigarra.up.pt%2Fffup%2Fpt%2Fpub_geral.show_file%3Fpi_gdoc_id%3D426815&usg=AFQjCNH9kyfSF4XIKr9

108. King A, Shenoy S. Evidence-based focused review of the status of hematopoietic stem cell transplantation as treatment of sickle cell disease and thalassemia. *Blood* [Internet]. 2014;123(20):3089–94. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/123/20/3089.abstract>
109. Bernaudin F, Socie G, Kuentz M, Chevret S, Duval M, Bertrand Y, et al. Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. *Blood* [Internet]. 2007;110(7):2749–56. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/110/7/2749.abstract>
110. Walters MC, Hardy K, Edwards S, Adamkiewicz T, Barkovich J, Bernaudin F, et al. Pulmonary, Gonadal, and Central Nervous System Status after Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2010;16(2):263–72. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2919571/>
111. Meier ER, Dioguardi J V., Kamani N. Current attitudes of parents and patients toward hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2015 [citado 10 de Setembro de 2017];62(7):1277–84. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pbc.25446/full>
112. Arnold SD, Bhatia M, Horan J, Krishnamurti L. Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease - current practice and new approaches. *Br J Haematol* [Internet]. 2016 [citado 15 de Agosto de 2017];174(4):515–25. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bjh.14167/full>
113. Walters MC, Patience M, Leisenring W, Eckman JR, Scott JP, Mentzer WC, et al. Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 1996;335(6):369–76. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199608083350601>
114. Gharwan H, Neary NM, Link M, Hsieh MM, Fitzhugh CD, Sherins RJ, et al. Successful fertility restoration after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Endocr Pract* [Internet]. 2014;20(9):e157–61. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4698818/>
115. Roux C, Amiot C, Agnani G, Aubard Y, Rohrlich P-S, Piver P. Live birth after ovarian tissue autograft in a patient with sickle cell disease treated by allogeneic bone marrow transplantation. *Fertil Steril* [Internet]. 2010;93(7):2413.e15-2413.e19. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.12.022>
116. Krishnamurti L, Abel S, Maiers M, Flesch S. Availability of unrelated donors for hematopoietic stem cell transplantation for hemoglobinopathies. *Bone Marrow Transpl* [Internet]. 2003;31(7):547–50. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1703887>
117. Ruggeri A, Eapen M, Scaravadou A, Cairo MS, Bhatia M, Kurtzberg J, et al. Umbilical Cord Blood Transplantation for Children with Thalassemia and Sickle Cell Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2011;17(9):1375–82. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3395002/>
118. Gluckman E. Allogeneic transplantation strategies including haploidentical

- transplantation in sickle cell disease. *Am Soc Hematol Educ B* [Internet]. 2013 [citado 10 de Setembro de 2017];2013(1):370–6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24319206>
119. Tisdale JF, Eapen M, Saccardi R. HCT for Nonmalignant Disorders. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2013;19(1):S6–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2012.10.007>
 120. Xu K, Shi Z, LL V, MR H, Rosenwaks Z. First unaffected pregnancy using preimplantation genetic diagnosis for sickle cell anemia. *JAMA* [Internet]. 1999;281(18):1701–6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.281.18.1701>
 121. Centro de Genética da Reprodução. Diagnóstico Genético Pré-Implantação [Internet]. 2014 [citado 10 de Setembro de 2017]. p. 9–11. Disponível em: <http://www.cgrabarros.pt/dgpi.htm>
 122. de São Pedro Soeiro CA. Diagnóstico Genético Pré-implantação [Internet]. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; 2012. Disponível em: https://sigarra.up.pt/ffup/pt/pub_geral.show_file?pi_gdoc_id=527634
 123. Geraedts J, De Wert G. Preimplantation genetic diagnosis. *Clin Genet* [Internet]. 2009 [citado 10 de Setembro de 2017];76(4):315–25. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-0004.2009.01273.x/abstract>
 124. Basille C, Frydman R, Aly A El, Hesters L, Fanchin R, Tachdjian G, et al. Preimplantation genetic diagnosis: State of the art. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2009;145(1):9–13. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.04.004>
 125. Simpson JL. Preimplantation genetic diagnosis at 20 years. *Prenat Diagn* [Internet]. 2010 [citado 10 de Setembro de 2017];30(7):682–95. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pd.2552/abstract>
 126. Amendah DD, Mvundura M, Kavanagh PL, Sprinz PG, Grosse SD. Sickle Cell Disease–Related Pediatric Medical Expenditures in the U.S. *Am J Prev Med* [Internet]. 2010;38(4):S550–6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amepre.2010.01.004>
 127. Matthes-Martin S, Pötschger U, Barr R, Martin M, Boztug H, Klingebiel T, et al. Costs and Cost-Effectiveness of Allogeneic Stem Cell Transplantation in Children Are Predictable. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2012;18(10):1533–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2012.04.002>
 128. Zennadi R, Chien A, Xu K, Batchvarova M, Telen MJ. Sickle red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. *Blood* [Internet]. 2008;112(8):3474 LP-3483. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/112/8/3474.abstract>
 129. Burnette AD, Nimjee SM, Batchvarova M, Zennadi R, Telen MJ, Nishimura J, et al. RNA Aptamer Therapy for Vaso-Occlusion in Sickle Cell Disease. *Nucleic Acid Ther* [Internet]. 2011;21(4):275–83. Disponível em: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/nat.2010.0270>
 130. Chang J, Patton JT, Sarkar A, Ernst B, Magnani JL, Frenette PS. GMI-1070, a novel pan-selectin antagonist, reverses acute vascular occlusions in sickle cell

- mice. *Blood* [Internet]. 2010;116(10):1779–86. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/116/10/1779.abstract>
131. Embury SH, Matsui NM, Ramanujam S, Mayadas TN, Noguchi CT, Diwan BA, et al. The contribution of endothelial cell P-selectin to the microvascular flow of mouse sickle erythrocytes in vivo. *Blood* [Internet]. 2004;104(10):3378–85. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/104/10/3378.abstract>
 132. Matsui NM, Borsig L, Rosen SD, Yaghmai M, Varki A, Embury SH. P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. *Blood* [Internet]. 2001;98(6):1955–62. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/98/6/1955.abstract>
 133. Kaul DK, Hebhel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2000;106(3):411–20. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI9225>
 134. Wun T, Styles L, DeCastro L, Telen MJ, Kuypers F, Cheung A, et al. Phase 1 Study of the E-Selectin Inhibitor GMI 1070 in Patients with Sickle Cell Anemia. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(7):1–12. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0101301>
 135. Telen MJ, Wun T, McCavit TL, De Castro LM, Krishnamurti L, Lanzkron S, et al. Randomized phase 2 study of GMI-1070 in SCD: reduction in time to resolution of vaso-occlusive events and decreased opioid use. *Blood* [Internet]. 2015;125(17):2656–64. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/125/17/2656.abstract>
 136. Mandarino D, Kavar Z, Alvarez R, Falconer D, Rollins SA, Rother RP. Placebo-Controlled, Double-Blind, First-In-Human, Ascending Single Dose and Multiple Dose, Healthy Subject Study Of Intravenous-Administered SelG1, a Humanized Anti-P-Selectin Antibody In Development For Sickle Cell Disease [abstract]. Stocker JW, editor. *Blood* [Internet]. 2013;122(21):970. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/122/21/970.abstract>
 137. Matsui NM, Varki A, Embury SH. Heparin inhibits the flow adhesion of sickle red blood cells to P-selectin. *Blood* [Internet]. 2002;100(10):3790–6. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/100/10/3790.abstract>
 138. Batchvarova M, Shan S, Zennadi R, Lindgren M, Leitgeb A, Sulila Tamsen P, et al. Sevuparin Reduces Adhesion Of Both Sickle Red Cells and Leukocytes To Endothelial Cells In Vitro and Inhibits Vaso-Occlusion In Vivo [abstract] [Internet]. 2013. p. 182. Disponível em: http://www.modustx.com/wp-content/uploads/2016/11/6_2013-ASH-Modus_abstract.pdf
 139. De Castro LM, Zennadi R, Jonassaint JC, Batchvarova M, Telen MJ. Effect of Propranolol as Antiadhesive Therapy in Sickle Cell Disease [Internet]. Vol. 5, *Clinical and Translational Science*. Malden, USA; 2012. p. 437–44. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cts.12005/abstract>
 140. De Castro LM. Study of Propranolol as Anti-Adhesive Therapy in Sickle Cell Disease (SCD) [Internet]. *ClinicalTrials.gov*. 2015 [citado 4 de Agosto de 2017]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01077921>
 141. Emanuele RM. FLOCOR™: a new anti-adhesive, rheologic agent. *Expert Opin*

- Investig Drugs [Internet]. 1998;7(7):1193–200. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1517/13543784.7.7.1193>
142. Orringer EP, Casella JF, Ataga KI, Koshy M, Adams-Graves P, Luchtman-Jones L, et al. Purified poloxamer 188 for treatment of acute vaso-occlusive crisis of sickle cell disease: A randomized controlled trial. JAMA [Internet]. 2001;286(17):2099–106. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1001/jama.286.17.2099>
 143. Cheung ATW, Chan MS, Ramanujam S, Rangaswami A, Curl K, Franklin P, et al. Effects of Poloxamer 188 Treatment on Sickle Cell Vaso-occlusive Crisis: Computer-Assisted Intravital Microscopy Study. J Investig Med [Internet]. 2004;52(6):402–6. Disponível em:
<http://jim.bmj.com/content/52/6/402.abstract>
 144. Hebbel RP. Ischemia-reperfusion Injury in Sickle Cell Anemia: Relationship to Acute Chest Syndrome, Endothelial Dysfunction, Arterial Vasculopathy, and Inflammatory Pain. Hematol Oncol Clin North Am [Internet]. 2014 [citado 7 de Setembro de 2017];28(2):181–98. Disponível em:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889858813001925>
 145. Wallace KL, Marshall MA, Ramos SI, Lannigan JA, Field JJ, Strieter RM, et al. NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN- γ and CXCR3 chemokines. Blood [Internet]. 2009;114(3):667–76. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2713467/>
 146. Field JJ, Nathan DG, Linden J. Targeting iNKT Cells for the Treatment of Sickle Cell Disease. Clin Immunol [Internet]. 2011;140(2):177–83. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3328191/>
 147. Wallace KL, Linden J. Adenosine A(2A) receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease. Blood [Internet]. 2010;116(23):5010–20. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3012594/>
 148. Nowak M, Lynch L, Yue S, Ohta A, Sitkovsky M, Balk SP, et al. The A2aR adenosine receptor controls cytokine production in iNKT cells. Eur J Immunol [Internet]. 2010;40(3):682–7. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2967447/>
 149. Linden J. Regulation of Leukocyte Function by Adenosine Receptors. Adv Pharmacol [Internet]. 2011;61:95–114. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4211873/>
 150. Zhang Y, Xia Y. Adenosine signaling in normal and sickle erythrocytes and beyond. Microbes Infect [Internet]. 2012;14(10):1–19. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3842013/>
 151. EMA. Rapiscan: EPAR - Product Information [Internet]. 2015. p. 1–29. Disponível em:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/001176/human_med_001378.jsp&mid=WC0b01ac058001d125
 152. Field JJ, Ataga KI, Majerus E, Eaton CA, Mashal R, Nathan DG. A Phase I Single Ascending Dose Study Of NKTT120 In Stable Adult Sickle Cell

- Patients [abstract]. Field JJ, editor. *Blood* [Internet]. 2013;122(21):977–977. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/122/21/977.abstract>
153. Scheuplein F, Thariath A, Macdonald S, Truneh A, Mashal R, Schaub R. A Humanized Monoclonal Antibody Specific for Invariant Natural Killer T (iNKT) Cells for In Vivo Depletion. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(9):e76692. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076692>
 154. Field JJ, Majerus E, Ataga KI, Vichinsky EP, Schaub R, Mashal R, et al. NNKTT120, an anti-iNKT cell monoclonal antibody, produces rapid and sustained iNKT cell depletion in adults with sickle cell disease. Eller K, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(2):1–14. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5289534/>
 155. Knight-Perry J, DeBaun MR, Strunk RC, Field JJ. Leukotriene pathway in sickle cell disease: a potential target for directed therapy [Internet]. Vol. 2, Expert Review of Hematology. Taylor & Francis; 2009. p. 57–68. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1586/17474086.2.1.57>
 156. Field JJ, Strunk RC, Knight-Perry JE, Blinder MA, Townsend RR, DeBaun MR. Urinary cysteinyl leukotriene E 4 significantly increases during pain in children and adults with sickle cell disease. *Am J Hematol* [Internet]. 2009 [citado 7 de Setembro de 2017];84(4):231–3. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.21370/full>
 157. Patel N, Gonsalves CS, Yang M, Malik P, Kalra VK. Placenta growth factor induces 5-lipoxygenase-activating protein to increase leukotriene formation in sickle cell disease. *Blood* [Internet]. 2009;113(5):1129–38. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2635078/>
 158. Elmariah H, Garrett ME, De Castro LM, Jonassaint J, Ataga KI, Eckman J, et al. Factors Associated with Survival in a Contemporary Adult Sickle Cell Disease Cohort. *Am J Hematol* [Internet]. 2014;89(5):530–5. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3988218/>
 159. Kato GJ, Martyr S, Blackwelder WC, Nichols JS, Coles WA, Hunter LA, et al. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br J Haematol* [Internet]. 2005;130(6):943–53. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2065864/>
 160. Haynes J, Obiako B, King JA, Hester RB, Ofori-Acquah S. Activated neutrophil-mediated sickle red blood cell adhesion to lung vascular endothelium: role of phosphatidylserine-exposed sickle red blood cells. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* [Internet]. 2006;291(4):H1679–85. Disponível em: <http://ajpheart.physiology.org/content/291/4/H1679.abstract>
 161. Kuvibidila S, Surendra Baliga B, Gardner R, Yu L, Warriar R, Velez M, et al. Differential effects of hydroxyurea and zileuton on interleukin-13 secretion by activated murine spleen cells: Implication on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 and vasoocclusion in sickle cell anemia. *Cytokine* [Internet]. 2005 [citado 7 de Setembro de 2017];30(5):213–8. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104346660500044X>
 162. Haynes J, Surendra Baliga B, Obiako B, Ofori-Acquah S, Pace B. Zileuton induces hemoglobin F synthesis in erythroid progenitors: role of the L-

- arginine–nitric oxide signaling pathway. *Blood* [Internet]. 2004 [citado 7 de Setembro de 2017];103(10):3945–50. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/103/10/3945.full.pdf?sso-checked=true>
163. Chang J, Shi PA, Chiang EY, Frenette PS. Intravenous immunoglobulins reverse acute vaso-occlusive crises in sickle cell mice through rapid inhibition of neutrophil adhesion. *Blood* [Internet]. 2008;111(2):915–23. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/111/2/915.abstract>
 164. Turhan A, Jenab P, Bruhns P, Ravetch J V, Collier BS, Frenette PS. Intravenous immune globulin prevents venular vaso-occlusion in sickle cell mice by inhibiting leukocyte adhesion and the interactions between sickle erythrocytes and adherent leukocytes. *Blood* [Internet]. 2004;103(6):2397–400. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/103/6/2397.abstract>
 165. Hoppe C, Kuypers F, Larkin S, Hagar W, Vichinsky E, Styles L. A pilot study of the short-term use of simvastatin in sickle cell disease: effects on markers of vascular dysfunction. *Br J Haematol* [Internet]. 2011 [citado 7 de Setembro de 2017];153(5):655–63. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/51036255_A_pilot_study_of_the_short-term_use_of_simvastatin_in_sickle_cell_disease_Effects_on_markers_of_vascular_dysfunction
 166. Atweh GF, Sutton M, Nassif I, Boosalis V, Dover GJ, Wallenstein S, et al. Sustained Induction of Fetal Hemoglobin by Pulse Butyrate Therapy in Sickle Cell Disease. *Blood* [Internet]. 1999;93(6):1790–7. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4269326/>
 167. Reid ME, El Beshlawy A, Inati A, Kutlar A, Abboud MR, Haynes J, et al. A double-blind, placebo-controlled phase II study of the efficacy and safety of 2,2-dimethylbutyrate (HQB-1001), an oral fetal globin inducer, in sickle cell disease. *Am J Hematol* [Internet]. 2014 [citado 12 de Setembro de 2017];89(7):709–13. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajh.23725>
 168. Kutlar A, Reid ME, Inati A, Taher AT, Abboud MR, El-Beshlawy A, et al. A dose-escalation phase IIa study of 2,2-dimethylbutyrate (HQB-1001), an oral fetal globin inducer, in sickle cell disease. *Am J Hematol* [Internet]. 2013 [citado 12 de Setembro de 2017];88(11):E255–60. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.23533/full>
 169. Kutlar A, Ataga K, Reid M, Vichinsky EP, Neumayr L, Blair-Britt L, et al. A Phase 1/2 Trial of HQB-1001, an Oral Fetal Globin Inducer, in Sickle Cell Disease. *Am J Hematol* [Internet]. 2012;87(11):1017–21. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3904792/>
 170. Meiler SE, Wade M, Kutlar F, Yerigenahally SD, Xue Y, Moutouh-de Parseval LA, et al. Pomalidomide augments fetal hemoglobin production without the myelosuppressive effects of hydroxyurea in transgenic sickle cell mice. *Blood* [Internet]. 2011;118(4):1109–12. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/118/4/1109.abstract>
 171. Moutouh-de Parseval LA, Verhelle D, Glezer E, Jensen-Pergakes K, Ferguson GD, Corral LG, et al. Pomalidomide and lenalidomide regulate erythropoiesis

- and fetal hemoglobin production in human CD34(+) cells. *J Clin Invest* [Internet]. 2008;118(1):248–58. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117764/>
172. Misra H, Lickliter J, Kazo F, Abuchowski A. PEGylated Carboxyhemoglobin Bovine (SANGUINATE): Results of a Phase I Clinical Trial. *Artif Organs* [Internet]. 2014 [citado 12 de Setembro de 2017];38(8):702–7. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aor.12341/abstract>
 173. Salvaggio JE, Arnold CA, Banov CH. Long-Term Anticoagulation in Sickle-Cell Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 1963;269(4):182–6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM196307252690403>
 174. Shah N, Willen S, Telen MJT, Ortel TL. Prophylactic Dose Low Molecular Weight Heparin (dalteparin) For Treatment Of Vaso-Occlusive Pain Crisis In Patients With Sickle Cell Disease. *Blood* [Internet]. 2013 [citado 13 de Setembro de 2017];122(21):2241. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/122/21/2241>
 175. Wun T, Paglieroni T, Field C, Welborn J, Cheung A, J Walker N, et al. Platelet-erythrocyte adhesion in sickle cell disease [abstract] [Internet]. Vol. 47, *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 1999. p. 121–7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=wun+1999+platelet-erythrocyte+adhesion>
 176. Brittain JE, Knoll CM, Ataga KI, Orringer EP, Parise L V. Fibronectin bridges monocytes and reticulocytes via integrin $\alpha 4\beta 1$. *Br J Haematol* [Internet]. 2008 [citado 4 de Setembro de 2017];141(6):872–81. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2141.2008.07056.x/full>
 177. Lee SP, Ataga KI, Zayed M, Manganello JM, Orringer EP, Phillips DR, et al. Phase I study of eptifibatide in patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2007 [citado 4 de Setembro de 2017];139(4):612–20. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2007.06787.x>
 178. Desai PC, Brittain JE, Jones SK, McDonald A, Wilson DR, Dominik R, et al. A Pilot Study of Eptifibatide for Treatment of Acute Pain Episodes in Sickle Cell Disease. *Thromb Res* [Internet]. 2013;132(3):341–5. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3791139/>
 179. Ohno K, Tanaka H, Samata N, Jakubowski JA, Tomizawa A, Mizuno M, et al. Platelet activation biomarkers in Berkeley sickle cell mice and the response to prasugrel. *Thromb Res* [Internet]. 2014;134(4):889–94. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2014.07.035>
 180. Tasan I, Jain S, Zhao H. Use of Genome Editing Tools to Treat Sickle Cell Disease [Internet]. Vol. 135, *Human genetics*. 2016. p. 1011–28. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27250347>
 181. Postnote. Gene Therapy [Internet]. Postnote. UK Parliamentary Office of Science and Technology; 2005. p. 1–4. Disponível em: <http://researchbriefings.parliament.uk/ResearchBriefing/Summary/POST-PN-240>
 182. Bodine DM. Gene therapy for sickle cell disease marches on. *Blood* [Internet].

- 2003;102(13):4247. Disponível em:
<http://www.bloodjournal.org/content/102/13/4247.1.abstract>
183. May C, Rivella S, Callegari J, Heller G, Gaensler KML, Luzzatto L, et al. Therapeutic haemoglobin synthesis in β -thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human β -globin. *Nature* [Internet]. 2000;406(6791):82–6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/35017565>
 184. Goncz K, Prokopishyn N, Chow B, Davis B, Gruenert D. Application of SFHR to gene therapy of monogenic disorders. *Gene Ther* [Internet]. 2002;9(11):691–4. Disponível em:
<https://www.nature.com/gt/journal/v9/n11/full/3301743a.html>
 185. Olowoyeye A, Okwundu CI. Gene therapy for sickle cell disease [Internet]. Olowoyeye A, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2016 [citado 3 de Setembro de 2017]. Disponível em:
<http://www.cochranelibrary.com/enhanced/doi/10.1002/14651858.CD007652.pub5>
 186. Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, Payen E, Tighe R, Bouhassira EE, et al. Correction of Sickle Cell Disease in Transgenic Mouse Models by Gene Therapy. *Science* (80-) [Internet]. 2001;294(5550):2368–71. Disponível em:
<http://science.sciencemag.org/content/294/5550/2368.abstract>
 187. Levasseur DN, Ryan TM, Pawlik KM, Townes TM. Correction of a mouse model of sickle cell disease: lentiviral/antisickling β -globin gene transduction of unmobilized, purified hematopoietic stem cells. *Blood* [Internet]. 2003;102(13):4312–9. Disponível em:
<http://www.bloodjournal.org/content/102/13/4312.abstract>
 188. Sadelain M, Rivella S, Lisowski L, Samakoglu S, Rivière I. Globin gene transfer for treatment of the β -thalassemias and sickle cell disease. *Best Pract Res Clin Haematol* [Internet]. 2004;17(3):517–34. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.beha.2004.08.002>
 189. Pestina TI, Hargrove PW, Jay D, Gray JT, Boyd KM, Persons DA. Correction of Murine Sickle Cell Disease Using γ -Globin Lentiviral Vectors to Mediate High-level Expression of Fetal Hemoglobin. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* [Internet]. 2009;17(2):245–52. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2670570/>
 190. Abraham A, Jacobsohn DA, Bollard CM. Cellular therapy for sickle cell disease. *Cytotherapy* [Internet]. 2016;18(11):1360–9. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.06.011>
 191. Hendrie PC, Russell DW. Gene Targeting with Viral Vectors. *Mol Ther* [Internet]. 2005;12(1):9–17. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.04.006>
 192. Henriques SFD. Generation and characterization of novel adenoviral vectors for hybrid nuclease-mediated gene targeting [Internet]. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2013. Disponível em:
<http://hdl.handle.net/10451/9431>
 193. Deng C, Capecchi MR. Reexamination of gene targeting frequency as a

- function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1992;12(8):3365–71. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC364584/>
194. Bollag RJ, Watdman AS, Liskay RM. Homologous Recombination in Mammalian Cells. *Annu Rev Genet* [Internet]. 1989;23(1):199–225. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.23.120189.001215>
 195. Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, Wilson JH. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001;98(15):8403–10. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC37450/>
 196. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2010;11(9):636–46. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg2842>
 197. Wah DA, Bitinaite J, Schildkraut I, Aggarwal AK. Structure of FokI has implications for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998;95(18):10564–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC27934/>
 198. Cathomen T, Keith Joung J. Zinc-finger Nucleases: The Next Generation Emerges. *Mol Ther* [Internet]. 2008;16(7):1200–7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2008.114>
 199. Carroll D. Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases. Wahl LM, editor. *Genetics* [Internet]. 2011;188(4):773–82. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3176093/>
 200. Carlson DF, Fahrenkrug SC, Hackett PB. Targeting DNA With Fingers and TALENs. *Mol Ther Nucleic Acids* [Internet]. 2012;1(1):e3. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3381595/>
 201. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, et al. Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* [Internet]. 2010;186(2):757–61. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2942870/>
 202. Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, et al. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2011;39(1):359–72. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3017587/>
 203. Boch J, Bonas U. Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annu Rev Phytopathol* [Internet]. 2010;48(1):419–36. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>
 204. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* [Internet]. 2009;326(5959):1509–12. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/326/5959/1509>
 205. Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* (80-) [Internet]. 2009;326(5959):1501. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/326/5959/1501>

206. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc [Internet]. 2013;8(11):2281–308. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3969860/>
207. DeWitt M, Magis W, Bray NL, Wang T, Berman JR, Urbinati F, et al. Efficient Correction of the Sickle Mutation in Human Hematopoietic Stem Cells Using a Cas9 Ribonucleoprotein Complex. bioRxiv [Internet]. 2016; Disponível em: <http://biorxiv.org/content/early/2016/01/15/036236.abstract>